ISSN 2186-7976

March 5, 2021
令和３年３月５日発行

Annual Meeting of the Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry, 2021

大会講演要旨集

■２０２１年度(令和３年度)大会[仙台]■



公益社団法人日本農芸化学会

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

© Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry

目次

授賞式，受賞者講演，受賞者一覧 ---------- 2
一般講演番号の見方 ---------- 10
一般講演発表プログラム ---------- 11
一般講演発表要旨 ---------- 59
大会シンポジウムプログラム ---------- 1,357
大会シンポジウム要旨 ---------- 1,367
スポンサードシンポジウムプログラム ---------- 1,506
スポンサードシンポジウム広告要旨 ---------- 1,508

日本農芸化学会（2020・2021 年度）

学会賞等授賞式，受賞者講演，受賞者一覧

学会賞等授賞式、受賞者講演（日本農芸化学会賞、日本農芸化学会功績賞、農芸化学技術賞）
日時：2021 年 3 月 18 日（木）10 時～17 時 50 分
場所：ホテルメトロポリタン仙台 4F 千代（宮城県仙台市青葉区中央 1-1-1）
仙台から Zoom ライブ配信

受賞者講演（農芸化学奨励賞、女性研究者賞、若手女性研究者賞、女性企業研究者賞）
日時：2021 年 3 月 19 日（金）10 時～16 時 40 分
受賞講演者と Zoom で繋ぎ、ライブ配信

【2021 年 3 月 18 日（木）】

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

2021 年度学会賞等授賞式
1 授賞選考委員長報告
2 日本農芸化学会賞授与
3 日本農芸化学会功績賞授与
4 農芸化学技術賞授与
5 農芸化学奨励賞授与

（11：00） **2020 年度農芸化学女性研究者賞等授与式**
1 授賞選考委員長報告
2 農芸化学女性研究者賞授与
3 農芸化学若手女性研究者賞授与
4 農芸化学女性企業研究者賞授与

2021 年度農芸化学女性研究者賞等授賞式
1 授賞選考委員長報告
2 農芸化学女性研究者賞授与
3 農芸化学若手女性研究者賞授与
4 農芸化学女性企業研究者賞授与

（11：30） **第 17 回・第 18 回農芸化学研究企画賞表彰式**
1 産学官学術交流委員長報告
2 農芸化学研究企画賞表彰

（11：45） **2019・2020 BBB 論文賞、BBB Most-Cited Paper Award および BBB Most-Cited Review Award**
1 英文誌編集委員長報告

（11：55） **会長祝辞**

（12：00） ****** 休憩 60 分間 *****

（13：00） **2020・2021 日本農芸化学会賞受賞者講演**（4 件、各 25 分）

（14：40） ****** 休憩 10 分間 *****

（14：50） **2020・2021 日本農芸化学会功績賞受賞者講演**（4 件、各 20 分）

（16：10） ****** 休憩 10 分間 *****

（16：20） **2020・2021 農芸化学技術賞受賞者講演**（6 件、各 15 分）

（17：50） 第 1 日目講演終了

【2021年3月19日（金）】

（10：00） **2020年度農芸化学奨励賞受賞者講演**（10件、各10分）

（11：40） ****** 休憩10分間 *****

（11：50） **2021年度農芸化学奨励賞受賞者講演**（10件、各10分）

（13：30） ****** 休憩10分間 *****

（13：40） **2020・2021農芸化学女性研究者賞受賞者講演**（6件、各10分）

（14：40） ****** 休憩5分間 *****

（14：45） **2020・2021農芸化学若手女性研究者賞受賞者講演**（6件、各10分）

（15：45） ****** 休憩5分間 *****

（15：50） **2020・2021農芸化学女性企業研究者賞受賞者講演**（5件、各10分）

（16：40） 受賞講演終了

2020年度受賞者

【日本農芸化学会賞】（2 件, 50 音順）

河岸 洋和　（静岡大学グリーン科学技術研究所）
「高等菌類由来の生物活性物質に関する化学的研究」

高木 博史　（奈良先端科学技術大学院大学）
「酵母のストレス耐性に関する新規な分子機構と高機能開発」

【日本農芸化学会功績賞】（2 件, 50 音順）

板谷 光泰　（高機能遺伝子デザイン技術研究組合）
「ゲノム合成からゲノム移動までの一気通貫システム開発」

鈴木 秀之　（京都工芸繊維大学大学院）
「バクテリアによるγ-グルタミル化合物代謝の遺伝生化学的・構造生物学的研究とその応用展開」

【農芸化学技術賞】（3 件, 50 音順）

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

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

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

【農芸化学奨励賞】（10 件, 50 音順）

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

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

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

尾形 慎　（福島大学農学群食農学類）
「酵素法を基盤とした糖質複合分子の機能設計に関する研究」

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

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

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

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

樋口 裕次郎　(九州大学大学院農学研究院)
「真菌における膜交通に関する分子細胞生理学研究」
増田 裕一　(三重大学大学院生物資源学研究科)
「天然由来ペプチドの活性発現に係わる三次元構造の解明と応用」

【農芸化学女性研究者賞】(3 件, 50 音順)
市 育代　(お茶の水女子大学基幹研究院)
「脂肪酸の栄養状態で変化する生体応答の制御機構に関する研究」
稲葉 靖子　(宮崎大学農学部)
「種子植物の生殖器官における発熱分子機構とミトコンドリア特性に関する研究」
西村 麻里江　(農業・食品産業技術総合研究機構)
「植物病原性糸状菌をモデルに用いた糸状菌における環境認識と応答に関する研究」

【農芸化学若手女性研究者賞】(3 件, 50 音順)
國武 絵美　(三重大学大学院生物資源学研究科)
「糸状菌におけるリグノセルロース分解酵素遺伝子の発現制御機構に関する分子生物学的研究」
河村 奈緒子　(岐阜大学研究推進・社会連携機構)
「シアル酸含有糖鎖の合成研究および細胞膜ドメイン解析のための糖脂質プローブの開発」
千葉 洋子　(理化学研究所・環境資源科学研究センター)
「未知の中心的代謝酵素の探索と性状解析ー生命の多様性および進化の理解を目指して」

【農芸化学女性企業研究者賞】(2 件, 50 音順)
久保田 浩美　(花王株式会社スキンケア研究所)
「日用品・食品の開発につながる微生物制御の基礎研究」
土屋 友理　(キリンホールディングス株式会社)
「発酵中にホップを添加する製法による発酵促進とその応用」

【第 17 回農芸化学研究企画賞】(2 件)
研究領域① 先導的生物活性物質研究と新技術開発
(1) 革新的医薬医療を志向した生物活性物質の探索・合成・生産等の研究と新技術開発
(2) 革新的農林水産物生産を志向した生物活性物質研究と新技術開発
赤澤 真一　(長岡工業高等専門学校 物質工学科)
「ミミズ細胞を用いた全く新しいバイオ医薬品生産宿主の開発」
研究領域③ グリーンバイオテクノロジー
(1) 有用物質生産ならびにバイオマス資源の生産・供給・利用に関わるテクノロジー
(2) 省資源・省エネルギープロセスに関わるバイオテクノロジー
(3) 環境浄化・資源循環に関わるバイオテクノロジー
織田 昌幸　(京都府立大学大学院生命環境科学研究科)
「クチナーゼ Cut190 の PET 分解能向上による実用化のための基盤及び実証研究」

2021 年度受賞者
【日本農芸化学会賞】(2 件, 50 音順)
中山 亨　(東北大学大学院工学研究科)
「植物フラボノイドの生合成と構造的多様性に関する酵素科学的研究」
松田 一彦　(近畿大学農学部)
「昆虫の神経イオンチャネルと除虫菊によるピレスリン生合成の制御に関する化学生物学的研究」

【日本農芸化学会功績賞】(2 件, 50 音順)
稲垣 賢二　(岡山大学大学院環境生命科学研究科)
「微生物由来の産業用酵素の探索, 構造機能解析とバイオテクノロジーへの応用」

吉村 徹　（名古屋大学大学院生命農学研究科）
「アミノ酸代謝関連酵素の分子基盤と機能開発」

【農芸化学技術賞】（3 件，50 音順）
釜阪 寛・田中 智子・滝井 寛（江崎グリコ株式会社）
「歯の修復およびその加速化に関する革新的技術開発」
首藤 正彦・古川 美子・伊賀瀬 道也・福田 直大（株式会社えひめ飲料、松山大学薬学部、愛媛大学医学部、愛媛県経済労働部）
「河内晩柑の機能性を活かし中高年者の認知機能維持に貢献する果汁飲料の開発」
サッポロビール株式会社
「ビール製造工程の微生物管理向上への一貫した取組み」

【農芸化学奨励賞】（10 件，50 音順）
石橋 洋平　（九州大学大学院農学研究院）
「新規脂質代謝酵素および制御因子に関する生物横断的研究」
伊藤 晋作　（東京農業大学生命科学部）
「作物根寄生生物による宿主植物認識機構の制御」
伊藤 智和　（名古屋大学大学院生命農学研究科）
「高度に保存されたビタミン B6 結合タンパク質の機能解析と応用展開」
小倉 由資　（東京大学大学院農学生命科学研究科）
「顕著な生物活性を有する芳香族および含酸素環式天然有機化合物に関する合成化学的研究」
Thanutchaporn Kumrungsee　（広島大学大学院統合生命科学研究科）
「ヒスチジン含有機能性ペプチドの探索、および応用研究」
黒木 勝久　（宮崎大学農学部）
「生物進化に伴った硫酸転移酵素機能の多様性に関する研究」
佐藤 道大　（静岡県立大学薬学部）
「酵素的[4+2]環化付加反応の分子機構の解明」
田代 陽介　（静岡大学学術院工学領域）
「細菌が生産する小胞の機能と形成機構に関する研究」
二神 泰基　（鹿児島大学農学部附属焼酎・発酵学教育研究センター）
「白麹菌のクエン酸高生産機構に関する研究」
丸田 隆典　（島根大学学術研究院農生命科学系）
「植物環境順応におけるアスコルビン酸と活性酸素種の相互作用に関する研究」

【農芸化学女性研究者賞】（3 件，50 音順）
豊島 由香　（お茶の水女子大学ヒューマンライフイノベーション研究所）
「タンパク質栄養状態の悪化によって稼働する肝脂質蓄積機構に関する研究」
藤田 直子　（秋田県立大学生物資源科学部）
「イネの澱粉生合成メカニズムの解明から機能性や異なる食感を付与した米品種の開発」
柳瀬 笑子　（岐阜大学応用生物科学部）
「発酵茶製造時におけるカテキン類の酸化重合反応に関する研究」

【農芸化学若手女性研究者賞】（3 件，50 音順）
乙木 百合香　（東北大学大学院農学研究科）
「神経変性疾患の予防法開発に向けたプラズマローゲンの機能解明」
堀 千明　（北海道大学大学院工学研究院）
「植物バイオマス分解利用に関する基礎研究」
山田 千早　（東京大学大学院農学生命科学研究科）
「ヒト・動物の腸内に生息する嫌気性細菌の代謝機能に関する研究」

【農芸化学女性企業研究者賞】（3 件，50 音順）
内田（丸木） 裕子　（森永製菓株式会社研究所）
「ポリフェノールの機能性研究とその商品応用」

土橋 英恵　（株式会社 明治 乳酸菌研究）
「生乳由来乳酸菌に関する研究」
宮崎 絹子　（ハウス食品グループ本社株式会社）
「油脂中のリスク物質の新規分析法開発とその応用」

【第 18 回農芸化学研究企画賞】（3 件，50 音順）
岡島 俊英　（大阪大学産業科学研究所）
「多剤耐性細菌感染治療に有効な次世代型抗菌薬の開発」
田上 貴祥　（北海道大学大学院農学研究院）
「ブタ血液を原料とする酵素製剤の開発と糖尿病治療薬研究への応用」
野中 健一　（北里大学大村智記念研究所微生物資源研究センター）
「昆虫疑似感染モデルを利用した昆虫寄生菌類分離法の確立と殺虫剤リード化合物の探索」

【2021 年度日本農学賞受賞者（本会推薦）】
本会より推薦した下記の者が日本農学賞を受賞いたしました。
2021 年 4 月 6 日に開催される日本農学大会において、日本農学賞授与式並びに受賞者講演が予定されています。
受　賞　者：桑原 重文　（東北大学大学院農学研究科）
受 賞 題 目：顕著な生物活性を有する天然有機化合物の合成化学的研究

【2019 年 (Vol.83) BBB 論文賞(掲載順)】(10 件)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

【2019年Most-Cited Paper Award】被引用回数 22 回

Vol.82 No.3, pp.456～465
Xu, Weiran; He, Liang; Li, Ying; Tan, Yan; Zhang, Fan; Xu, Hong
Silencing of lncRNA ZFAS1 inhibits malignancies by blocking Wnt/-catenin signaling in gastric cancer cells

【2019年Most-Cited Review Award】被引用回数 30 回

Vol.82, No.4, pp.600～610
Kaeko Murota, Yoshimasa Nakamura & Mariko Uehara
Flavonoid metabolism: the interaction of metabolites and gut microbiota

【2020 年 (Vol.84) BBB 論文賞(掲載順)】(11 件)

pp.31～36 Sayuki Oka, Ryo Kuniba, Nozomi Tsuboi, Sayaka Tsuchida, Kazunari Ushida, Shusuke Tomoshige & Kouji Kuramochi
Isolation, synthesis, and biological activities of a bibenzyl from *Empetrum nigrum* var. *japonicum*

pp.118～125 Tatsuya Nishiyama, Woro Triarsi Sulistyaningdyah, Kenji Ueda & Hitoshi Kusakabe
GABA enzymatic assay kit

pp.305～313 Mari Iwase, Shoko Sakai, Shigeto Seno, Yu-Sheng Yeh, Tony Kuo, Haruya Takahashi, Wataru Nomura, Huei-Fen Jheng, Paul Horton, Naoki Osato, Hideo Matsuda, Kazuo Inoue, Teruo Kawada & Tsuyoshi Goto
Long non-coding RNA 2310069B03Rik functions as a suppressor of Ucp1 expression under prolonged cold exposure in murine beige adipocytes

pp.421～427 Atsushi Shigeto, Atsushi Wada & Kenji Kumazawa
Identification of the novel odor active compounds “p-menthane lactones” responsible for the characteristic aroma of fresh peppermint leaf

pp.734～742 Mayu Suzuki, Kairi Koubara, Mihoko Takenoya, Kazuhiro Fukano, Shinsaku Ito, Yasuyuki Sasaki, Akira Nakamura& Shunsuke Yajima
Single amino acid mutation altered substrate specificity for L-glucose and inositol inscyllo-inositol dehydrogenase isolated from *Paracoccus laeviglucosivorans*

pp.764～773 Yusuke Okamoto, Maiko Tomioka, Fumihiko Ogasawara, Kota Nagaiwa, Yasuhisa Kimura, Noriyuki Kioka & Kazumitsu Ueda
C-terminal of ABCA1 separately regulates cholesterol floppase activity and cholesterol efflux activity

pp.936～942 Junko Ohki, Akihiko Sakashita, Eitaro Aihara, Akihiko Inaba, Hironobu Uchiyama, Masahito Matsumoto, Yuzo Ninomiya, Takumi Yamane, Yuichi Oishi & Ken Iwatsuki
Comparative analysis of enteroendocrine cells and their hormones between mouse intestinal organoids and native tissues

pp.1062～1068 Tomoyuki Takeya, Miyabi Yamakita, Daisuke Hayashi, Kento Fujisawa, Yasuyoshi Sakai & Hiroya Yurimoto
Methanol production by reversed methylotrophy constructed in *Escherichia coli*

pp.1250～1258 Reiko Nagasaka, Hazuki Nakachi, Yuka Onodera, Yuki Ishikawa & Toshiaki Ohshima
Leptin promotes the fat preference associated with low-temperature acclimation in mice

pp.1475～1485 Masaki Asano, Fumika Nakano, Eriko Nakatsukasa & Tsuyoshi Tsuduki
The 1975 type Japanese diet improves the gut microbial flora and inhibits visceral fat accumulation in mice

pp.1706～1713 Satomi Hirai & Toshiyuki Kawasumi
Enhanced lactic acid bacteria viability with yeast coincubation under acidic conditions

【2020年Most-Cited Paper Award】被引用回数 16 回

Vol.82 No.1, pp.31～41

Hiroe Aoyama, Hiroshi Sakagami & Tsutomu Hatano

Three new flavonoids, proanthocyanidin, and accompanying phenolic constituents from *Feijoa sellowiana*

【2020年Most-Cited Review Award】被引用回数 22 回

Vol.82, No.4, pp.584～599

Satoshi Hachimura, Mamoru Totsuka & Akira Hosono

Immunomodulation by food: impact on gut immunity and immune cell function

一般講演番号の見方

○ 講演番号の

最初の１桁の数字は講演発表日

２ ⟶ ３月１９日（金）
３ ⟶ ３月２０日（土）
４ ⟶ ３月２１日（日）

次のアルファベット（大文字）はミーティングルームを示す記号

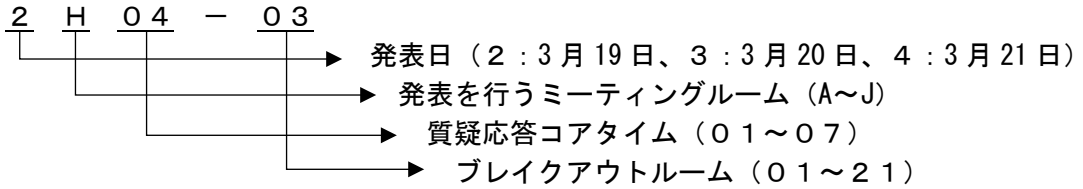
Ａ～Ｊ
（ミーティングルームはＡからＪまであります。）

次の数字は各ミーティングルームにおける質疑応答コアタイムを示す数字

０１～０７
各数字におけるコアタイムは下記の通りです。
０１：9:00～9:30、 ０２：9:30～10:00、 ０３：10:00～10:30、
０４：10:30～11:00、０５：11:00～11:30、０６：13:00～13:30、
０７：13:30～14:00

ミーティングルームＡ、Ｃ、Ｅ、Ｇ、Ｉでは０１から０６まで、
ミーティングルームＢ、Ｄ、Ｆ、Ｈ、Ｊでは０２から０７まであります。

ハイフンの後の数字は質疑応答コアタイム内のブレイクアウトルーム番号（０１～２１）

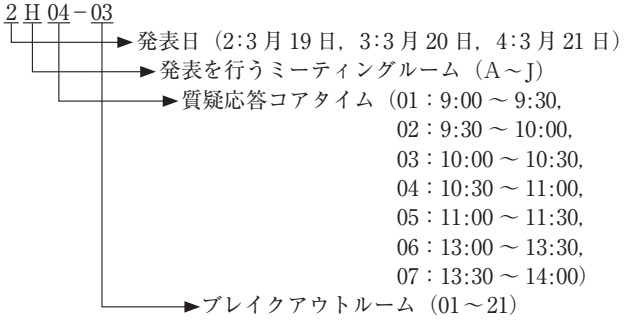


たとえば、**２Ｈ０４-０３**は、

３月１９日（金）、ミーティングルームＨ、質疑応答コアタイム 10：30～11：00、ブレイクアウトルーム３ での発表になります。

一般講演発表プログラム

1. 発表・質疑応答時間（質疑応答コアタイム）は 30 分となります.
2. ○は口頭発表者を示します.
3. 質疑応答コアタイムにおける進行役は，20〜22ページの進行役一覧をご覧ください.
4. 講演番号は以下のようになります.



（例）「2H04-03」は，3 月 1 9 日（金），ミーティングルーム H，質疑応答コアタイム 10：30〜11：00，ブレイクアウトルーム 3 での発表になります.

第 2 日（3 月 19 日）

講演番号　　演　題　　発表者氏名（所属）

ミーティングルーム A 質疑応答コアタイム 9:00〜9:30

微生物―物質生産 - 微生物変換，微生物酵素反応 / 細胞 - 情報伝達，細胞応答，ストレス応答 / 遺伝子 - 発現制御，トランスクリプトーム―

2A01-01　III 型 PKS を利用した methylmalonyl-CoA からの新規多置換芳香族化合物の合成
○飯塚 恭平[1]，石井 義孝[2]，桐村 光太郎[1]（[1]早大院先進理工，[2]早大理工総研）

2A01-02　麹床を用いた高麗人参含有メジャージンセノサイドのマイナージンセノサイドへの変換
○杉本 学[1]，村上 允唯[2]（[1]岡山大植物研，[2](株)機能性食品開発研究所）

2A01-03　土壌微生物における *C*- 配糖体代謝の初発酵素反応
○渡辺 聖実，堀 早苗，寺下 柚子，橋本 義輝，熊野 匠人，小林 達彦（筑波大生命）

2A01-04　土壌微生物によるチアミン代謝
○熊野 匠人，室本 亮介，橋本 義輝，小林 達彦（筑波大生命）

2A01-05　Screening for biotransforming bacteria to produce Cycloastragenol from Astragaloside IV
Kishino Shigenobu[1]，○Takeuchi Daniel Makoto[1]，Ozeki Yuuki[2]，Fukami Hiroyuki[2]，Ogawa Jun[1]（[1]Kyoto University Graduate School of Agriculture，[2]Kobayashi Pharmaceutical Co.）

2A01-06　出芽酵母のプロテインキナーゼ A は，複合スフィンゴ脂質生合成破綻によって活性化される HOG 経路を負に制御する
○瓜田 敦哉[1]，柳瀬 由起美[1]，石橋 洋平[2]，谷 元洋[1]（[1]九州大理，[2]九州大農）

2A01-07　出芽酵母の複合スフィンゴ脂質構造多様性破綻による環境ストレス耐性能低下とその補填機構
○古賀 綾乃，高山 千廣，瓜田 敦哉，谷 元洋（九州大理）

2A01-08　酵母 *Saccharomyces cerevisiae* における翻訳後修飾を介した一酸化窒素の生理的役割の解明
○示野 誠也，那須野 亮，高木 博史（奈良先端大・バイオ）

2A01-09　窒素飢餓ストレス応答の制御による酵母の分岐鎖アルコール耐性の向上と耐性機構の解明
○黒田 浩一[1]，渡邉 幸夫[1]，Gerald R. Fink[2]，Gregory Stephanopoulos[3]，植田 充美[1]，Jose L. Avalos[4]（[1]京大院農，[2]Whitehead Institute for Biomedical Research，[3]MIT，[4]Princeton University）

2A01-10　酵母におけるペントースリン酸回路とイソブタノール耐性との関連性
○吉川 雄樹，那須野 亮，高木 博史（奈良先端科学技術大学院大学）

2A01-11　酵母 *Yarrowia lipolytica* における *n*- アルカンに対する転写応答機構の解析
○村山 怜子[1]，手崎 聡[1]，岩間 亮[1,2]，堀内 裕之[1,2]，福田 良一[1,2]（[1]東大院・農生科，[2]東大　微生物連携機構）

2A01-12　*Komagataella phaffii* 転写活性化因子 Mxr1 のメタノール濃度依存性遺伝子発現制御における機能領域の解析
○井上 紘一，由里本 博也，阪井 康能（京大院農）

2A01-13　黄麹菌 *Aspergillus oryzae* が有するカルボキシペプチダーゼ遺伝子 *ocpO, ocpA* の転写制御領域の解明
○沼澤 里佳，山形 洋平（農工大院応生化）

2A01-14　酵母コドン最適化グルコアミラーゼ遺伝子に存在する発現抑制配列の解析
○荒牧 孝弘[1]，菊田 浩希[1]，赤田 倫治[1,2,3]，星田 尚司[1,2,3]（[1]山口大院 創成科学・化学，[2]山口大中高温微生物セ，[3]山口大生命医工学セ）

2A01-15　メタノール誘導性転写因子 Mpp1 のプロモーター領域の解析
○岩瀬 公佑，井上 紘一，由里本 博也，阪井 康能（京大院農）

2A01-16　ICE_{KKS102}*4677* の接合伝達を制御する遺伝子発現制御機構
○松本 哲，永田 裕二，大坪 嘉行（東北大生命）

2A01-17　*Clostridium perfringens* の *agrBD* ノックアウト変異株におけるペリクル状バイオフィルム形成の分子機構の解明
○伊藤 暸[1]，重岡 愛莉[1]，本田 香代[1]，安達 桂香[1]，大谷 郁[2]，中山 二郎[1]（[1]九州大農，[2]東海大医）

ミーティングルーム A 質疑応答コアタイム 10:00〜10:30

微生物―遺伝子 - ゲノム解析，メタゲノム，プロテオーム，バイオインフォーマティクス / 細胞 - 構造，オルガネラ，小胞，分泌，細胞構成分子 / 物質生産 - 発酵（二次代謝産物，抗生物質，ペプチド，生理活性物質）―

2A03-01　γ -Hexachlorocyclohexane（HCH）汚染土壌のメタゲノム解析
○加藤 広海，田中 彩美，永田 裕二（東北大・院生命）

2A03-02　日本人とインドネシア人の乳幼児の腸内メタゲノム比較解析
○清野 峻彦[1]，堀野 美里[1]，田中 優[1]，山田 拓司[2]，林 哲也[3]，後藤 恭宏[3]，加藤 聖子[3]，實藤 雅文[4]，諸隈 誠一[3]，小川 昌宣[4]，Endang Rahayu[5]，中山 二郎[1]（[1]九州大学院農，[2]東工大生命理，[3]九州大学院医，[4]九州大環境発達医学研究センター，[5]ガジャ・マダ大農工）

2A03-03　クエン酸高生産菌 *Aspergillus tubingensis* WU-2223L のドラフトゲノムの決定
○吉岡 育哲[1]，高橋 弘喜[2,3,4]，楠屋 陽子[2]，矢口 貴志[2]，桐村 光太郎[1]（[1]早大・先進理工・応化，[2]千葉大・真菌センター，[3]千葉大・分子キラリティー研究センター，[4]千葉大・植物分子科学研究センター）

2A03-04　シングルセルゲノム情報を用いた未培養環境細菌のコンプリートゲノムの獲得
○小川 雅人[1,2]，細川 正人[3,4]，西川 洋平[2]，柳澤 有祐[1]，佐伯 達也[3]，依田 卓也[3]，竹山 春子[1,2,4,5]（[1]早大院先進理工，[2]早大・産総研CBBD-OIL，[3]bitBiome株式会社，[4]早大ナノライフ創新研，[5]早大先進生命動態研）

2A03-05　*Bacillus cereus* に感染する広宿主域ジャンボファージ vB\BceM_WH1 の特性とゲノム解析
○松中 南[1]，上土井 達哉[1]，タイン ヌグイエン コン[1]，飯田 拳史[1]，金 相完[1]，田代 康介[1]，大森 英樹[2]，大島 一能[2]，岩本 武夫[3]，廣政 恭明[1]，土居 克実[1]　([1]九州大農，[2]大阪工大，[3]慈恵医大)

2A03-06　麹菌 *Aspergillus oryzae* における選択的オートファジーレセプターの探索
○西尾 譲一郎，尾崎 愛奈，島田 侑希，武田 陽一，菊間 隆志 (立命館大)

2A03-07　麹菌 *Aspergillus oryzae* のヌクレオファジーにおけるオートファジー関連遺伝子 *Aoatg8* と *Aoatg15* の機能解析
○黄梅 昌朗[1]，藤田 純佳[1]，吉田 稔[1,2,3]，有岡 学[1,2]　([1]東大院農・応生工，[2]東大・微生物連携機構，[3]理研環境資源セ)

2A03-08　Identification and characterization of proteins involved in nucleophagy in *Aspergillus oryzae*
○Peng Junfeng[1]，Yoshida Minoru[1,2,3]，Arioka Manabu[1,2] ([1]Dept. Biotechnol., Univ. Tokyo，[2]CRIIM, UTokyo，[3]RIKEN CSRS)

2A03-09　黄麹菌 *Aspergillus oryzae* のエンドサイトーシスにおける AAA ATPase AipA の分子機構解析
○日浅 怜子，竹川 薫，樋口 裕次郎　(九大院生資環)

2A03-10　出芽酵母グリセロール輸送体 Stl1 のグルコース不活性化に必要な α - アレスチン Rod1 による Stl1 認識領域の探索
○藤田 翔貴，五味 勝也，新谷 尚弘　(東北大農)

2A03-11　発酵食品に由来する高ポリアミン産生菌の分離
○白澤 秀斗[1]，平野 里佳[1,2]，栗原 新[1]　([1]近畿大生物理工，[2]石川県大生資環)

2A03-12　講演取消

2A03-13　有機溶媒蒸気を用いた *Monascus* 橙黄色色素の選択的生産
○澁谷 駿太[1]，橘 信二郎[2]，小田 忍[1]　([1]金沢工大ゲノム研，[2]琉球大農)

2A03-14　ヤセウツボの種子発芽阻害物質および生産菌の同定
○今田 理彩，永田 真梨，甲斐 建次，炭谷 順一，川口 剛司，谷 修治　(阪府大院・生環科)

2A03-15　網羅的代謝解析に基づく新規ハプト藻 *Pavlova* sp. フコキサンチン生産技術の開発
○吉田 江里菜，加藤 悠一，金本 昭彦，蓮沼 誠久，近藤 昭彦 (神戸大)

2A03-16　イソペンテニルピロリン酸メチル化導入酵素遺伝子及びカロテノイド生合成遺伝子を導入した組換え大腸菌を用いた新規 C41 カロテノイドの創製に関する研究
○高木 千陽[1]，阿部 百花[1]，佐々木 茜[1]，金子 優海[1]，伊藤 歩[1]，酒見 裕香[1]，眞岡 孝至[2]，Breitenbach Jurgen[3]，Sandmann Gerhard[3]，新藤 一敏[1]　([1]日女大家政食物，[2]生産開発研究所，[3]Johann Wolfgang Goethe大学)

ミーティングルームA 質疑応答コアタイム 11:00～11:30

微生物―細胞 - 情報伝達，細胞応答，ストレス応答 / 遺伝子 - 発現制御，トランスクリプトーム / その他―

2A05-01　シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 における DnaA-*oriC* システムの機能化
○末崎 裕寛[1]，荷村(松根) かおり[1]，大林 龍胆[2]，渡辺 智[1]　([1]東京農大院・バイオ，[2]東工大・化生研)

2A05-02　過酷な環境から単離された微細藻類の光酸化ストレス耐性獲得プログラムのオミクス解析
○豊島 拓樹[1]，佐保 好亮[1]，川口 遼太[1]，オユン スブドエルデネ[1]，江口 知輝[1]，石毛 太一郎[2]，高市 真一[3]，川崎 信治[1,3]　([1]東農大バイオ，[2]東農大ゲノム解析セ，[3]東農大微生物)

2A05-03　過酷な生育環境から単離した微細藻類の新規な光酸化ストレス耐性に関与するタンパク質
○佐保 好亮[1]，豊島 拓樹[1]，オユン スブドエルデネ[1]，川口 遼太[1]，江口 和輝[1]，川崎 信治[1,2]　([1]東農大バイオ，[2]東農大微生物)

2A05-04　走化性発現に関わる細菌由来ペクチン結合タンパク質のドメインダイナミクス
○穴水 康太郎[1]，髙瀬 隆一[1]，日尾 守[2]，渡辺 大輔[1]，三上 文三[3]，橋本 渉[1]　([1]京大院農，[2]京大農，[3]京大生存研)

2A05-05　希少放線菌 *Actinoplanes missouriensis* の胞子嚢において休眠と覚醒を制御するシグマ - アンチシグマ因子制御系の機能解析
○手塚 武揚[1,2]，光山 京太[1]，大西 康夫[1,2]　([1]東大院・農生科・応生工，[2]東大・微生物連携機構)

2A05-06　生育期に伴って変化するペプチドグリカン層が TiO_2 光触媒殺菌効果に及ぼす影響の解析
○槻 あかね[1]，藤嶋 昭[2]，鈴木 智順[1,2]　([1]東理大応生，[2]東理大総研)

2A05-07　グラム陰性細菌のペプチドグリカン層が光触媒殺菌効果に与える影響の解析
○菅佐原 ことね[1]，藤嶋 昭[1,2]，鈴木 智順[1,2]　([1]東理大応生，[2]東理大総研)

2A05-08　放線菌 *Streptomyces vietnamensis* における bald 変異株の特性解析
○小林 匠[1,2]，森本 諒[1,2]，丸山 友子[1,2]，濱渦 亮子[1]，保坂 毅[1,2] ([1]信州大・バイオメディカル研，[2]信州大院・総合理工)

2A05-09　有明海から単離した乳酸菌を含む培養液が農作物バイオマス量の増大にもたらす効果の野外検証について
○木原 久美子[1]，安藤 千治[2]　([1]熊本高専，[2]株式会社安藤通商)

2A05-10　スクミリンゴガイとボウフラに食毒性を示す微生物由来タンパク質毒素
○武部 聡[1]，吉相 真也[1]，東 慶直[1]，早川 徹[2]　([1]近大生物理工，[2]岡山大院ヘルスシステム統合科学)

2A05-11　大腸菌 K-12 株におけるピルビン酸応答転写因子 PdhR によるゲノム転写制御ネットワークの解明
○安西 拓実[1]，今村 壮輔[2]，石浜 明[3]，島田 友裕[1]　([1]明治大・農，[2]東工大・化生研，[3]法政大・マイクロナノテク研)

2A05-12　DNA 構造パラメーターを用いた麹菌由来転写因子 AoXlnR 制御メカニズムの網羅的解析
○岡 大椰[1]，兒島 孝明[1]，井原 邦夫[2]，小林 哲夫[1]，中野 秀雄[1] ([1]名古屋大学大学院生命農学研究科，[2]名古屋大学遺伝子実験施設)

2A05-13　*Serratia plymuthica* における小分子 RNA によるキチン分解酵素系の制御
○小嶋 優常[1]，堀井 恭子[1]，宗像 直輝[1]，熊木 智耶[2]，石田 知輝[2]，杉本 華幸[1,2]，鈴木 一史[1,2]　([1]新潟大院・自然科学，[2]新潟大・農)

2A05-14　好気性窒素固定細菌 Azotobacter vinelandii におけるニトロゲナーゼを酸素から保護する機構の解明に向けたトランスクリプトーム解析
○滝本 廉[1]，立道 祐輝[2]，黒田 浩一[1]，植田 充美[1]　([1]京大院農，[2]キッコーマン株式会社)

2A05-15　出芽酵母におけるクロマチン構造の人工制御システムの開発
○山本 凌大，天井 貴光，植田 充美，黒田 浩一　(京大院農)

ミーティングルームA 質疑応答コアタイム 13:00～13:30

微生物―細胞 - 構造，オルガネラ，小胞，分泌，細胞構成分子 / 代謝 - 代謝調節，発酵生理，メタボローム / 物質生産 - 微生物変換，微生物酵素反応―

2A06-01　黄麹菌 *Aspergillus oryzae* における AoCdc48 の生理機能解析
○守田 湧貴，竹川 薫，樋口 裕次郎　(九大院・生資環)

2A06-02　分裂酵母に特有な新規 VPS 遺伝子の機能解析
○稲川 智章，大久保 和真，樋口 裕次郎，竹川 薫　(九州大農)

2A06-03　酵母小胞体におけるタンパク質フォールディングを改善する因子のスクリーニング方法の開発
○瀧井 佳歩[1]，寶関 淳[2]，阪井 康能[1]　([1]京大院農，[2]京都先端大バイオ環境)

2A06-04　*Saccharomyces eubayanus* における細胞内小器官の動態
○高橋 朋子[1,2]，加藤 拓[2]，只見 秀代[2]，永富 康司[2]，岩間 亮[1,3]，堀内 裕之[1,3]，野田 陽一[1,3]（[1]東大・院農生科・応生工，[2]アサヒクオリティーアンドイノベーションズ(株)醸造科学研究所，[3]東大・微生物連携機構）

2A06-05　分裂酵母におけるホスホリパーゼの機能解析
○中村 大地，奥津 果優，吉﨑 由美子，髙峯 和則，二神 泰基，玉置 尚徳（鹿児島大農）

2A06-06　糸状菌 *Aspergillus terreus* におけるエルゴチオネインの生合成に関する研究
○林 大三[1]，福井 志帆[2]，浜田 勇和[1]，村田 紋奈[1]，柿崎 徹也[1]，鈴木 孝征[1,3]，金政 真[1,2]（[1]中部大院・応生，[2]中部大・環生科，[3]中部大・応生化）

2A06-07　プロテアソーム阻害剤の Ashbya gossypii のリボフラビン生産に与える影響
○横森 愛美[1]，鈴木 里歩[2]，畔上 純也[1]，朴 龍洙[3]，加藤 竜也[3]（[1]静大・総科技院，[2]静大農，[3]静大グリーン研）

2A06-08　微細藻類ユーグレナのワックスエステル発酵制御に関わる WSRK 下流因子の解析
○駒井 陽輔[1]，石井 侑樹[1]，小川 貴央[1]，丸田 隆典[1]，重岡 成[2]，石川 孝博[1]（[1]島根大院・自然科学，[2]近畿大・附属農場）

2A06-09　分裂酵母における窒素源としてのアミノ酸選択機構の解析
○田渕 稔二[1]，西村 慎一[1,2]，松山 晃久[1,3]，吉田 稔[1,2,3,4]（[1]東大院農・応生工，[2]東大・微生物イノベ，[3]理研CSRS・ケミカルゲノミクス，[4]理研CSRS・創薬シード）

2A06-10　分裂酵母および出芽酵母の Pos5 が CoQ 生合成に影響する
○西原 昇瑚[1]，西田 郁久[2,3]，柳井 良太[2]，松尾 安浩[1,2,4]，戒能 智宏[1,2,4]，川向 誠[1,2,4]（[1]島根大院・自然科学，[2]島根大・生物資源，[3]新潟大・日本酒学，[4]島根大・農生命科学系）

2A06-11　安息香酸は分裂酵母のコエンザイム Q 生合成を顕著に阻害する
○西田 郁久[1,2]，柳井 良太[1]，松尾 安浩[1,3]，戒能 智宏[1,3]，川向 誠[1,3]（[1]島根大生物資源，[2]新潟大日本酒学，[3]島根大農生命系）

2A06-12　ジャーファーメンターを用いた低酸素培養における G-body 形成条件の検討
○村田 有紀，三浦 夏子，片岡 道彦（大阪府大生命環境）

2A06-13　出芽酵母アルコールデヒドロゲナーゼの G-body 局在化シグナル配列(GFoS-tag)による細胞代謝調節効果の検証
○内海 亮太郎，吉村 柚紀，三浦 夏子，片岡 道彦（阪府大院生命環境）

2A06-14　生体触媒による光学活性ブテノライドの合成
櫻井 篤，石井 修介，川島 丈，吉富 翔悟，○冨宿 賢一（明星大理工）

2A06-15　未殺菌ハチミツから単離された *Zygosaccharomyces siamensis* kiy1 における糖アルコール生産
○岩田 寛[1]，松波 咲代[2]，柏木 豊[2]，前橋 健二[2]，吉川 潤[2]（[1]東農大院応生，[2]東農大応生）

2A06-16　酢酸を生成するメタン資化細菌 *Methylocaldum marinum* S8 と非メタン資化細菌の共生系
○竹内 美緒[1]，尾崎 遥[2]，平岡 聡[3]，鎌形 洋一[1]，坂田 将[1]，吉岡 秀佳[1]，岩崎 渉[4]（[1]産総研，[2]筑波大，[3]海洋開発機構，[4]東京大学）

ミーティングルームB 質疑応答コアタイム 9:30～10:00

微生物―物質生産 - 醸造，発酵（一次代謝産物）/ 細胞 - 情報伝達，細胞応答，ストレス応答 / 細胞 - 構造，オルガネラ，小胞，分泌，細胞構成分子―

2B02-01　ゲノム編集システムを用いたクエン酸生産糸状菌におけるミトコンドリア局在型クエン酸輸送体遺伝子ノックアウト株の作製と性能評価
○大浦 智之，吉岡 育哲，脇本 紗梨，桐村 光太郎（早大院先進理工）

2B02-02　白麹菌における α - アミラーゼ AmyB の機能解析
○山口 正晃[1]，門岡 千尋[2]，奥津 果優[1]，吉﨑 由美子[1]，髙峯 和則[1]，後藤 正利[3]，玉置 尚徳[1]，二神 泰基[1]（[1]鹿大院農林水産，[2]筑波大生命環境，[3]佐賀大農）

2B02-03　白麹菌における MAP キナーゼを介したクエン酸生産制御機構の解析
○池田 萌[1]，門岡 千尋[2]，奥津 果優[1]，吉﨑 由美子[1]，髙峯 和則[1]，後藤 正利[3]，玉置 尚徳[1]，二神 泰基[1]（[1]鹿大院農林水産，[2]筑波大生環，[3]佐賀大農）

2B02-04　製麹工程における麹菌 FlbC の発現と酵素遺伝子発現との関わり
○伊藤 一成[1]，谷野 有佳[1]，五味 勝也[2]，狩山 昌弘[3]，花房 裕子[1]，三宅 剛史[1]（[1]岡山県工技セ，[2]東北大院農・生物産業創成，[3]株式会社フジワラテクノアート）

2B02-05　イメージング質量分析を用いた米麹内タンパク質分布の可視化
○谷野 有佳[1]，伊藤 一成[1]，五味 勝也[2]，狩山 昌弘[3]，三宅 剛史[1]（[1]岡山県工技セ，[2]東北大院農，[3]株式会社フジワラテクノアート）

2B02-06　c-di-GMP の合成促進による電気化学活性バイオフィルムの活性化
○松元 陽歩，高妻 篤史，渡邉 一哉（東薬大生命）

2B02-07　緑膿菌細胞間コミュニケーションを制御する可動性因子の解析
○上原 礼佳[1]，須澤 由希[2]，遠矢 正城[2]，吉澤 晋[4]，小暮 一啓[4]，野村 暢彦[1,3]，豊福 雅典[1,3]（[1]筑波大・生命環境系，[2]筑波大院・生命環境，[3]筑波大・MiCS，[4]東京大・大気海洋研）

2B02-08　捕食性細菌デロビブリオ属細菌の PQS クォーラムセンシング新規アッセイ法への応用
○星子 裕貴[1]，門上 希和夫[2]，ガルシア･コントレラス ロドルフォ[3]，前田 憲成[1]（[1]九工大院生命体，[2]北九州大環技研，[3]メキシコ国立自治大医）

2B02-09　酢酸菌 *Acetobacter pasteurianus* SKU1108 の耐熱化育種株 TH-3 の耐熱化機構解析
○松本 奈実[1,3]，松谷 峰之介[2]，片岡 尚也[1,3,4]，藥師 寿治[1,3,4]，松下 一信[1,3,4]（[1]山口大院創成科学，[2]東農大ゲノム解析セ，[3]山口大農，[4]山口大中高温微セ）

2B02-10　絶対嫌気性菌 *Clostridium acetobutylicum* の酸化ストレス存在下における生育停止機構に関する研究
○宇津 智晴，青木 麻由，和泉 翔，川崎 信治（東京農業大学）

2B02-11　糸状菌 *Aspergillus oryzae* の *CHO2/PEM1* オルソログの機能解析と菌糸生長への影響
○須澤 徹生[1]，岩間 亮[1,2]，福田 良一[1,2]，堀内 裕之[1,2]（[1]東大農，[2]東大　微生物連携機構）

2B02-12　糸状菌 *Aspergillus nidulans* における Sec14 ファミリータンパク質の生理的機能の解析
○楊 淳児[1]，須澤 徹生[1]，岩間 亮[1,2]，福田 良一[1,2]，堀内 裕之[1,2]（[1]東大農，[2]東大　微生物連携機構）

2B02-13　セルラーゼ高生産糸状菌 *Trichoderma reesei* の形態観察にむけた菌糸伸長制御マイクロ流体デバイスの開発
○井谷 綾花[1]，北原 雪菜[1]，志田 洋介[1]，大倉 玲子[2]，若本 祐一[2]，小笠原 渉[1]（[1]長岡技科大・工，[2]東大院・総合）

2B02-14　麹菌における核増加の分子機構
○細田 柊志[1]，安井 瑞稀[1]，門岡 千尋[1]，高谷 直樹[1]，織田 健[2]，竹下 典男[1]（[1]筑波大，[2]酒総研）

ミーティングルームB 質疑応答コアタイム 10:30～11:00

微生物―物質生産 - 発酵（二次代謝産物，抗生物質，ペプチド，生理活性物質）/ 細胞 - 情報伝達，細胞応答，ストレス応答 / 細胞 - 分離，分類，生態―

2B04-01　しょうゆ麹菌を用いたエルゴチオネインの高発酵生産
○佐竹 遼子，市川 惠一，原 精一，伊藤 考太郎（キッコーマン株式会社）

2B04-02　麹菌による異種天然物生産における分化制御因子の改変の効果
○原中 実穂[1]，齋藤 直也[1]，片山 琢也[1,2]，南 篤志[3]，及川 英秋[3]，丸山 潤一[1,2]（[1]東大院・農生科・応生工，[2]東大・微生物連携機構，[3]北大院・理）

2B04-03　麹菌におけるゲノム編集を利用した代謝遺伝子多重導入による異種天然物生産性の向上
○齋藤 直也[1]，片山 琢也[1,2]，南 篤志[3]，及川 英秋[3]，丸山 潤一[1,2]（[1]東大院・農生科・応生工，[2]東大・微生物連携機構，[3]北大院・理）

2B04-04　黄麹菌 *Aspergillus oryzae* におけるコウジ酸生合成遺伝子 *kojA* のプロモーターを使用したポリケチドの長期間生産
○玉野 孝一[1,2]，國永 万保子[1]，小島 直[3]，梅村 舞子[1]，町田 雅之[1]，小池 英明[1]（[1]産総研生物プロセス，[2]産総研CBBD-OIL，[3]産総研健康医工学）

2B04-05　製麹過程における黒麹菌による 1-octen-3-ol 生産プロファイルと脂肪酸オキシゲナーゼ *ppo* 発現動態の関連性
○片岡 涼輔[1]，渡邉 泰祐[1,2]，山田 修[3]，荻原 淳[1,2]（[1]日大院生資科・生資利用，[2]日大生資科・生命化，[3]酒総研）

2B04-06　海洋単利株 FT01 の金属腐食性バイオフィルム形成による鉄飢餓応答
○伊藤 菜々子[1]，尾花 望[2,3]，渡辺 宏紀[1]，稲葉 知大[4]，宮野 泰征[5]，野村 暢彦[3,6]（[1]筑波大院・生命環境，[2]筑波大・医学医療系・TMRC，[3]筑波大・MiCS，[4]産総研・環境管理，[5]秋田大院・理工，[6]筑波大・生命環境系）

2B04-07　金属腐食性海洋細菌 FT01 株の金属腐食関連遺伝子の探索
○宮川 大[1]，尾花 望[3,5]，伊藤 菜々子[2]，宮野 泰征[6]，野村 暢彦[4,5]（[1]筑波大・生命環境，[2]筑波大院・生命環境，[3]筑波大・医学医療系・TMRC，[4]筑波大・生命環境系，[5]筑波大・MiCS，[6]秋田大院・理工）

2B04-08　Induction of mass production of lipase and polyester by fatty alcohol stress
○ISHIZUKA Morio[1], Ito Haruhi[1], Otsuka Taku[1], Kanda Yuki[1], Saito Aya[1], Horikoshi Mana[1], Inoue Kaori[1], KATSURAGI Shu[1], SAKUTA Moeka[1], NIHEI Ai[1], Akanuma Genki[2], Ushio Kazutoshi[3]（[1]Department of Applied Chemistry, Chuo University, [2]Department of Life Science, Gakushuin University, [3]Department of Applied Chemistry and Biotechnology, Niihama National College）

2B04-09　*Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* の酸素ストレス耐性に関与する遺伝子の探索
○山本 裕司，磯 奏子，熊谷 菜美子，鳥谷部 茉奈，向井 孝夫（北里大獣）

2B04-10　*Proteus mirabilis* のプトレッシンエクスポーター PstSCAB の同定
○平野 里佳[1,2]，太田 宏一[1]，杉山 友太[1]，紺谷 優季[2]，阪中 幹祥[1]，栗原 新[1,2]（[1]石川県大生資環，[2]近畿大生物理工）

2B04-11　Characterization and genome structure of broad host range phage vB_EkoM5VN infecting Enterobacter and Citrobacter species
○Nguyen Cong Thanh[1,2], Yasuhiro Fujino[1], Kosuke Tashiro[1], Takeo Iwamoto[3], Yasuaki Hiromasa[1], Katsumi Doi[1]（[1]Kyushu Univ., [2]Plant Protection Research Institute, [3]Jikei Univ.）

2B04-12　Draft genome sequence of Salinispora sp. Strain H7-4, isolated from deep-sea sediments of the Shikoku Basin
○Ulanova Dana[1,2], Uenaka Yuka[1], Sakama Masazumi[1], Sakurai Tetsuya[1,2]（[1]Fac. Agric. Mar. Sci., Kochi Univ., [2]Cent. Adv. Mar. Core Res., Kochi Univ.）

2B04-13　藻食性魚類から単離した *Vibrio* 属細菌のテリトリー形成
○田部 卓磨，秋吉 英雄，吉田 真明，川向 誠（島根大学）

2B04-14　自家蛍光シグネチャー解析による微生物の生死判別及び死因の推測
○張 譯云[1]，高部 響介[2]，下段 千尋[1]，野村 暢彦[2,3]，八幡 穣[2,3]（[1]筑波大・生命環境学群，[2]筑波大・生命環境系，[3]筑波大・微生物サステイナビリティ研究センター）

2B04-15　シングルセルラマン分光と機械学習を用いた原核生物の非破壊微生物種識別
○菅野 菜々子[1]，加藤 真悟[2]，松井 求[3]，重藤 真介[1]（[1]関西学院大・院理工，[2]理研BRC，[3]東大・院理）

ミーティングルームB 質疑応答コアタイム 13:30～14:00

微生物―細胞 - 分離，分類，生態 / 遺伝子 - 発現制御，トランスクリプトーム / 物質生産 - 醸造，発酵（一次代謝産物）―

2B07-01　伝統的水産系発酵食品“くさや”からの新規海洋性放線菌の分離とその微生物学的特徴
○竹内 葵[1]，篠田 佳那[1]，喜多 孝介[2]，池浦 祐史[2]，佐藤 拓海[3]，長田 隆弘[4]，荒川 賢治[5]，石川 森夫[1,2]，鈴木 敏弘[1,2]（[1]東農大院・醸造，[2]東農大・醸造，[3]東農大・分微，[4]長田商店，[5]広島大院・統合生命）

2B07-02　パッションフルーツ種子からの内生菌の分離
○石田 葵，古屋 俊樹（東京理科大院）

2B07-03　移動性の高いショウジョウバエからの野生酵母の単離と多様性
○清家 泰介[1,2]，阪田 奈津枝[1]，古澤 力[1,3]（[1]理研・生命機能科学，[2]大阪大学・大学院情報科学研究科，[3]東京大学・理学系研究科）

2B07-04　もみ殻マイココズム培養における *Trichoderma reesei* と土着微生物の協調的なバイオマス分解
○岩波 明季[1]，浦山 俊一[1,2]，萩原 大祐[1,2]（[1]筑波大生命環境，[2]筑波大・MiCS）

2B07-05　土壌環境における糸状菌 *Aspergillus nidulans* の二次代謝の生態的な役割の解析
○高田 万里奈[1]，河内 護之[3]，大西 康夫[3,4]，妹尾 啓史[3,4]，清水 公徳[2]，浦山 俊一[1,5]，萩原 大祐[1,5]（[1]筑波大・生命環境，[2]東理大・基礎工，[3]東大院・農生科，[4]東大・CRIIM，[5]筑波大・MiCS）

2B07-06　日光文化財に発生する真菌叢の網羅的解析と光触媒による抗真菌試験
○須崎 裕人[1]，小笠原 麻衣[1]，三浦 菜摘[1]，鈴木 孝宗[2]，寺島 千晶[2]，藤嶋 昭[2]，鈴木 智順[1,2]（[1]東理大応生，[2]東理大総研）

2B07-07　人工遺伝子回路トグルスイッチの遺伝子発現量制御
○兼廣 健吾[1]，濱田 浩幸[2]，花井 泰三[2]（[1]九大院シス生，[2]九大農）

2B07-08　*Geobacillus* 属好熱菌を宿主とした異種タンパク質高生産システム
○倉敷 凌太[1]，小山 幸祐[2]，大城 隆[2]，鈴木 宏和[2]（[1]鳥取大院・持続創生，[2]鳥取大・工）

2B07-09　麹菌 *Aspergillus oryzae* における転写因子 TrsA と TrsB による菌核形成制御機構の解析
○皆川 春香[1]，片山 琢也[1,2]，岡 大椰[3]，小川 真弘[4]，兒島 孝明[3]，中野 秀雄[3]，小山 泰二[4]，北本 勝ひこ[5]，丸山 潤一[1,2]（[1]東大院・農生科・応生工，[2]東大・微生物連携機構，[3]名大院・生命農，[4]野田産研，[5]日薬大・薬）

2B07-10　セルロース分解性昆虫共生ストレプトミセス属放線菌における，マンノース / マンノビオース応答性の解明
○大橋 慧介[1]，幡谷 省悟[2]，中田 朱音[1]，松本 一樹[1]，加藤 夏海[2]，キャメロン カリー[3]，ブライアン フォックス[3]，高須賀 太一[1,2]（[1]北大国際食，[2]北大農，[3]ウィスコンシン大）

2B07-11　セルロース分解性ストレプトマイセス属における，恒常的な酵素産生を目指した CRISPR/Cas によるゲノム編集技術の確立
○中田 朱音[1,2]，大橋 彗介[1,2]，高須賀 太一[1,2]（[1]北海道大学，[2]北海道大学大学院国際食資源学院）

2B07-12　壺造り黒酢由来乳酸菌の D-Ala 生産能と共培養が与える影響
○星 南穂子[1]，藤井 暁[2]，橋口 和典[2]，長野 正信[2]，亀谷 将史[1,3]，新井 博之[1,3]，石井 正治[1,3]（[1]東大院　農生科　応生工，[2]坂元醸造，[3]東大微生物連携機構）

2B07-13　乳酸菌 *Marinilactibatillus psychrotolerans* B7-9-5 株における好気的酢酸生成に関与する酵素の機能解析
○杉山 南，海野 良輔，松山 未央子，鈴木 敏弘，石川 森夫 （東農大院・醸造）

2B07-14　阿波晩茶の発酵に関与する乳酸菌の地域多様性と生理活性評価
○西岡 浩貴[1,2]，大野 智生[3]，岩橋 均[4]，堀江 祐範[5] （[1]徳島県工技セ，[2]岐阜大院・連合農学，[3]岐阜大院・自然科技，[4]岐阜大・応用生物，[5]産総研・健康医工学）

2B07-15　油脂生産酵母 *Rhodotorula toruloides* のオレイン酸含有量と油脂生産量向上に向けた研究
○高橋 祐斗[1]，呉 志展[1]，梶浦 裕之[1]，三崎 亮[1]，サビトリー リムトン[2]，藤山 和仁[1] （[1]阪大・生物工学国際交流センター，[2]カセサート大農）

2B07-16　油脂高生産に向けた *Rhodotorula toruloides* セルレニン耐性株の取得
○南方 真実[1]，呉 志展[1]，梶浦 裕之[1]，三崎 亮[1]，サビトリー リムトン[2]，藤山 和仁[1] （[1]阪大・生物工学国際交流センター，[2]カセサート大農）

ミーティングルームC 質疑応答コアタイム 9:00～9:30

酵素―アミノ酸代謝関連酵素，脂質代謝関連酵素 / 糖質代謝関連酵素―

2C01-01　哺乳類の PL レダクターゼ同定に向けた取り組み
○西山 尚来，伊藤 智和，邊見 久，吉村 徹 （名古屋大学）

2C01-02　超好熱菌 *Thermotoga maritima* におけるスレオニンデヒドラターゼの同定及び機能解析
○宮本 哲也，片根 真澄，齋藤 康昭，関根 正恵，本間 浩，加藤 くみ子 （北里大薬）

2C01-03　*Runella slithyformis* 由来メチオニンアデノシルトランスフェラーゼの機能解析および *S*- アデノシルメチオニンの酵素合成
○泉 しずく，佐分利 亘，森 春英 （北大院農）

2C01-04　メチオニン生合成における MetW による MetX の活性制御
○長谷部 文人 （静岡県大・食）

2C01-05　鞍掛豆 西山浸 98-5 由来 L- メチオニンγリアーゼの発現精製と性質検討
○大川 敦司[1]，手嶋 琢[2]，松井 健二[2]，根本 理子[1]，田村 隆[1]，稲垣 賢二[1] （[1]岡山大院・環境生命，[2]山口大院・創成科学）

2C01-06　ホスファチジルグリセロール特異的ホスホリパーゼCの精製と異種組換え発現検討
○梶山 聖人[1]，杉森 大助[2] （[1]福島大院，[2]福島大）

2C01-07　エタノールアミン型プラズマローゲン特異的ホスホリパーゼ D の異種組換え発現および機能解析
○野澤 俊貴[1]，川村 柚葉[1]，王 澤[2]，杉森 大助[2] （[1]福島大院理工，[2]福島大理工）

2C01-08　エタノールアミン型プラズマローゲン特異的ホスホリパーゼ D の基質特異性に及ぼす反応 pH，金属イオンの影響
○川村 柚葉[1]，野澤 俊貴[1]，王 澤[2]，杉森 大助[2] （[1]福島大院理工，[2]福島大理工）

2C01-09　高基質特異性 L- グルタミン酸オキシダーゼの活性中心残基 Glu617 への飽和変異導入による機能解析
○矢野 佳果[1]，松尾 慎作[1]，伊藤 菜奈子[2]，今田 勝巳[2]，日下部 均[3]，根本 理子[1]，田村 隆[1]，稲垣 賢二[1] （[1]岡山大院・環境生命，[2]阪大院・理，[3]エンザイムセンサ）

2C01-10　リジン高生産を目的としたホモクエン酸シンターゼ Lys20 の高機能化
○松下 智紀，磯貝 章太，西村 明，高木 博史 （奈良先端大・バイオ）

2C01-11　*Saccharomyces cerevisiae* の D- アミノ酸 *N*- アセチルトランスフェラーゼ（HPA3）の構造と機能に関する研究
○坂神 晴菜，伊藤 智和，岩崎 雄吾，邊見 久，吉村 徹 （名大院・生命農）

2C01-12　GH136 に属するラクト -*N*- ビオシダーゼホモログの結晶構造解析
○山田 千早[1,2]，片山 高嶺[3]，伏信 進矢[1,2] （[1]東大院・農生科，[2]東大　微生物連携機構，[3]京大院・生命）

2C01-13　D-,L- セリンによるセリンラセマーゼの酵素自殺基質反応様修飾の機構
○浜谷 朱梨[1]，伊藤 智和[1]，小川 拓哉[2]，邊見 久[1]，栗原 達夫[2]，吉村 徹[1] （[1]名古屋大院生命農，[2]京都大化学研究所）

2C01-14　分裂酵母由来 D- アミノ酸オキシダーゼの安定化に関する研究
○早河 瑞希，伊藤 智和，邊見 久，吉村 徹 （名古屋大生命）

2C01-15　プロリン高生産に関与するγ - グルタミルキナーゼ Pro1 変異体の機能解析
○高崎 友里恵，磯貝 章太，豊川 洋一，西村 明，高木 博史 （奈良先端大・バイオ）

2C01-16　耐熱性および熱活性化を示すクチナーゼの性質
○田口 七海，野﨑 功一 （信州大院・総合理工）

2C01-17　微生物ホスホリパーゼ D の反応機構解析
○岩元 遥香，後藤 友彰，DAMNJANOVIC Jasmina，中野 秀雄，岩崎 雄吾 （名大農）

ミーティングルームC 質疑応答コアタイム 10:00～10:30

生物科学―糖鎖科学 - 構造，機能，糖鎖工学，その他 / タンパク質・ペプチド科学 - 構造，機能，その他 / 生物工学 - 解析技術・方法論，その他―

2C03-01　ビフィズス菌由来新規 exo- α -D-fructofuranosidase の機構解析用フラノシド誘導体の合成研究
○石渡 明弘[1]，鹿島 騰真[2]，藤田 清貴[3]，伏信 進矢[2,4]，伊藤 幸成[1,5] （[1]理研開拓研究本部，[2]東大院農生科，[3]鹿大院農，[4]東大微生物連携機構，[5]阪大院理）

2C03-02　ガラクトヘプトースを用いた KRN7000 類縁体の設計と合成
○渡邊 健吾，髙澤 早希，西田 芳弘，土肥 博史 （千葉大院園芸）

2C03-03　*Haemophilus* 属 LPS のコア糖鎖の合成研究
○尾川 周平[1]，服部 朝渚[2]，一柳 剛[2] （[1]鳥取大院持続性社会，[2]鳥取大農）

2C03-04　Neisseria 属細菌が産生するリポオリゴ糖の内部コア 7 糖の合成研究
○一柳 剛[1]，大谷 直輝[2]，尾川 周平[2] （[1]鳥取大農，[2]鳥取大院持続性社会）

2C03-05　コアフコース含有 2 分岐複合型糖鎖 10 糖プローブの合成
○石井 希実，永田 光穂，髙垣 智迪，高橋 諭，江橋 竜史，佐藤 樹，松尾 一郎 （群馬大院理工）

2C03-06　ポリガラクツロナーゼ阻害タンパク質の発現，精製，阻害活性について
○山本 和樹[1]，倉田 淳志[2]，上垣 浩一[2] （[1]近大院農，[2]近大農）

2C03-07　サンゴ由来（*Acropora milepopa*）レクチン様タンパク質の機能解析
○古賀 萌子[1]，上村 亮介[1]，外山 諒[1]，海野 英昭[1]，畠山 智充[1]，郷田 秀一郎[1,2] （[1]長崎大工，[2]創価大理工）

2C03-08　醤油乳酸菌 *Tetragenococcus halophilus* 由来 Aspartate:Alanine 交換輸送体（AspT）の複合体構造
○山中 空，宮本 あかり，國井 宏太，七谷 圭，阿部 敬悦 （東北大農）

2C03-09　分子表面の芳香族アミノ酸クラスターがグルコアミラーゼのデンプン結合ドメインの構造安定性とアンフォールディングにおよぼす影響
○福富 瑚乃，鈴木 一史，杉本 華幸 （新潟大院　自然科学）

2C03-10　単細胞性シアノバクテリア由来フマラーゼの生化学的解析
○片山 徳賢[1]，小山内 崇[2] （[1]明治大院農，[2]明治大農）

2C03-11　簡便な DNA 抽出法開発に向けたイミダゾリウム修飾担体の構築と吸着溶出性能の基礎評価
○柿倉 泰明 （(地独)大阪産業技術研究所）

2C03-12　DNA コロイド結晶を反応場として活用する試み
横森 真麻[2]，○菅野 茂夫[1]，中村 彰良[1]，田川 美穂[2]　([1]産総研・生物プロセス，[2]名大・未来研)

2C03-13　Ribosome 生合成プロセス解析のための Selected reaction monitoring 法
○小坂 唯心[1]，森 めぐみ[1]，青木 航[1,2]，植田 充美[1,2]　([1]京都大学農学研究科応用生命科学専攻，[2]京都バイオ計測センター)

2C03-14　Improving the sensitivity of odor molecule detection in olfactory receptor-expressing cells
○LIAN Yujia[1]，TATEMATSU Kenji[1]，SAKAI Hinako[1]，SATO Sho[2]，KURODA Shun'ichi[1,2]　([1]Osaka Univ.，[2]Komi Hakko Corp.)

2C03-15　放射光 X 線を利用した生物素材・食品中のミネラル分布の可視化
○日高 將文，門田 佳奈，藤井 智幸　(東北大農)

ミーティングルーム C 質疑応答コアタイム 11:00～11:30

English Session―環境科学・バイオマス利用 / 酵素 / 微生物―

2C05-01　A new method for production of green biodiesel fuel using isopropanol as a co-solvent
○PHAM Thi Phuong Thao[1,4]，NGUYEN Huynh Phuong Uyen[2]，IMAMURA Kiyoshi[1]，FURUTA Masakazu[1]，MAEDA Yasuaki[3]　([1]Quantum and Radiation Engineering, Graduate School of Engineering, Osaka Prefecture University，[2]Sanicon Co. Ltd.，[3]Graduate School of Life and Environmental Science, Osaka Prefecture University，[4]Center for Research and Technology Transfer, Vietnam Academy of Science and Technology)

2C05-02　コレステロール低下作用を有する孟宗竹リグノヘミセルロースの調製と作用機構の解析
○王 建鵬[1]，平本 茂[1]，盧 超[1]，池山 菜緒[2]，雪 真弘[2]，大熊 盛也[2]，坂本 光央[2]，椎葉 究[1]　([1]東京電機大理工，[2]理研)

2C05-03　Screening and heterologous expression of fungal feruloyl esterases, a lignin-carbohydrate complex degrading enzymes, in *Pichia pastoris* X-33
○Phienluphon Apisan[1,2]，Kondo Keiko[2]，Nagata Takashi[1,2]，Katahira Masato[1,2]　([1]Grad. sch. of Energy Sci., Kyoto Univ.，[2]Inst. of Advanced Energy., Kyoto Univ.)

2C05-04　Subsurface Cultivation and Gasification (SCG) - What is the condition for the successful generation of biomethane in the SCG?
○UENO Akio[1]，Tamazawa Satoshi[1]，Tamamura Shuji[1]，Murakami Takuma[1]，Kiyama Tamotsu[1]，Inomata Hidenori[1]，Aramaki Noritaka[2]，Yamaguchi Shinji[3]，Naganuma Takeshi[4]，Kaneko Katsuhiko[1]　([1]H-RISE，[2]National Institute of Technology Kagawa College，[3]Mitsubishi Material Co. Ltd.，[4]Hiroshima University)

2C05-05　Source of oxygen in the phenol formation from benzene by nitrate-reducing *Azoarcus* sp. DN11
○DEVANADERA Allan[1]，SUZUKI-MINAKUCHI Chiho[1,2]，KASAI Yuki[3]，TAKAHATA Yoh[4]，OKADA Kazunori[1]，NOJIRI Hideaki[1,2]　([1]BRC, UTokyo，[2]CRIIM, UTokyo，[3]Chuo Univ.，[4]Taisei Corp.)

2C05-06　How do solid-phase humic substances (humin) serve as extracellular electron mediator in multiple anaerobic microbial reactions?
○Pham Minh Duyen，Kasai Takuya，Katayama Arata　(Nagoya Univ.)

2C05-08　Solvent engineering studies on recombinase polymerase amplification
○Juma Kevin Maafu[1]，Kojima Kenji[1]，Akagi Shihomi[1]，Hayashi Kaichi[1]，Takita Teisuke[1]，O'Sullivan Ciara K[2,3]，Fujiwara Shinsuke[4]，Nakura Yukiko[5]，Yanagihara Itaru[5]　([1]Grad. Sch. of Agric., Kyoto Univ.，[2]Universitat Rovira i Virgili，[3]ICREA，[4]Sch. of Sci. and Technol., Kwansei－Gakuin Univ.，[5]Osaka Women's and Children's Hospital)

2C05-09　Study on enzyme inhibition activity of solubilized Chaga (*Inonotus Obliquus*) obtained through hydrothermal treatment.
○Hamsan Hazwanee[1]，Kushizaki Asuka[2]，Matsuda Kouhei[2]，Demura Mikihide[2]，Noma Seiji[2]，Konishi Teruko[3]，Tsujita Tadayuki[2]，Hayashi Nobuyuki[2]　([1]Kagoshima Univ.，[2]Saga Univ.，[3]Ryukyu Univ.)

2C05-12　Functional analysis of maltose utilization related genes in Aspergillus oryzae
○Zou Yahong，Zhan Sitong，Shintani Takahiro，Gomi Katsuya　(Tohoku Univ.)

2C05-13　Physiology and genomic analysis of forgotten deoxycholic acid producer, *Eubacterium* sp. c-25
○Song Isaiah[1]，Fukiya Satoru[1]，Gotoh Yasuhiro[2]，Ogura Yoshitoshi[3]，Hayashi Tetsuya[2]，Yokota Atsushi[1]　([1]Hokkaido Univ.，[2]Kyushu Univ.，[3]Kurume Univ.)

2C05-14　A novel gene cluster is involved in the degradation of lignin-derived monoaromatics in *Thermus oshimai* JL-2
○CHAKRABORTY Joydeep[1]，SUZUKI-MINAKUCHI Chiho[1,2]，TOMITA Takeo[1,2]，OKADA Kazunori[1]，NOJIRI Hideaki[1,2]　([1]BRC, UTokyo，[2]CRIIM, UTokyo)

2C05-15　Genetic and functional analysis of Siderophore in Methylobacterium aquaticum 22A
○Juma Patrick[1]，Alessa Ola[1]，Fujitani Yoshiko[1]，Oyama Tokitaka[2]，Yurimoto Hiroya[3]，Sakai Yasuyoshi[3]，Tani Akio[1]　([1]IPSR, Okayama Univ.，[2]Grad. Sch. Sci., Kyoto Univ.，[3]Grad . Sch. Agric., Kyoto Univ.)

2C05-16　Functional characterization of *Candida albicans* ABC transporter Cdr1: altered drug transport caused by mutations in transmembrane segment 7
○SHEN Xiaoxian，NIIMI Kyoko，NIIMI Masakazu，KAJIWARA Susumu　(Tokyo Institute of Technology)

2C05-17　Altered gut microbiome of Indonesian obese and T2D subjects that associates with diet and drug
○THERDTATHA Phatthanaphong[1]，SONG Yayi[1]，TANAKA Masaru[1]，MARIYATUN Mariyatun[2]，ALMUNIFAH Miisaroh[2]，MANURUNG Nancy Eka Putri[2]，INDRIARSIH Siska[2]，LEE Yuan-Kun[3]，RAHAYU Endang Sutriswati[2]，NAKAYAMA Jiro[1]　([1]Kyushu University，[2]Universitas Gadjah Mada，[3]University of Singapore)

ミーティングルーム C 質疑応答コアタイム 13:00～13:30

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

2C06-01　植物発酵物(FBP)の青枯病防除効果
○緋田 安希子[1]，鳥居 英人[2]，河本 亮[2]，藤岡 耕太郎[2]，岸田 晋輔[2]，田島 誉久[1]，加藤 純一[1]　([1]広島大院・統合生命，[2]万田発酵株式会社)

2C06-02　酵母資材がイチゴ根圏土壌微生物へ与える影響の評価
○猪原 英之[1]，高崎 智子[2]，北川 隆徳[1]，坂野 克久[1]　([1]アサヒクオリティーアンドイノベーションズ株式会社，[2]アサヒバイオサイクル株式会社)

2C06-03　里山環境での土地利用法ごとの微生物群集構造の解析
○藤原 夕莉，堀沢 栄　（高知工科大学）

2C06-04　土壌肥沃度指標（SOFIX）による二次林の管理に対する土壌環境の解析
○大野 雅貴，荒木 希和子，久保 幹　（立命館大生命）

2C06-05　ハマトビムシの褐藻分解の仕組みの解明を目的とした腸管内微生物のメタゲノム解析
○弓岡 潤矢[1]，中村 晟一朗[2]，馬場 保徳[1,2,3]，河井 重幸[1,2,3]　([1]石川県大生物資源，[2]石川県大院生物資源，[3]石川県大生物資源研)

2C06-06　微生物代謝を用いたリグニン由来芳香族物質からのβ-ケトアジピン酸の生産
○鈴木 悠造[1]，大塚 祐一郎[1]，荒木 拓馬[1]，上村 直史[2]，政井 英司[2]，中村 雅哉[1]　([1]森林総研，[2]長岡技科大・生物)

2C06-07　マイクロ波化学反応によるサトウキビバガスからの抗ウイルス活性リグニンの生産
○木村 智洋[1]，李 瑞波[1]，應田 涼太[3]，西村 裕志[1]，藤田 尚志[2]，渡辺 隆司[1]　([1]京大生存研，[2]京大ウイルス・再生研，[3]北大医)

2C06-08　草食性陸ガニのリグニン類縁体酸化酵素群の解析
○三宅 克英[1]，安部 水葉[1]，小川 晃史[1]，下村 真司[1]，坂本 大樹[1]，馬場 保徳[2]　([1]名城大理工，[2]石川県大資源研)

2C06-09　*Acinetobacter* 属細菌によるリグニンモデル化合物のエーテル結合の切断
○大谷 早紀[1]，羽部 浩[2]，古屋 俊樹[1]　([1]東京理科大院・理工，[2]産総研・環境管理)

2C06-10　酵母を用いた一貫バイオプロセスによるダンチクからのエタノール生産 条件の検討
○菰田 恵菜，山中 優花，堀沢 栄　（高知工科大学）

2C06-11　地下環境における木材生物分解に関与する微生物群集
○岡野 大輝[1]，原 忠[2]，堀沢 栄[1]　([1]高知工科大学，[2]高知大)

2C06-12　コリネ型細菌の代謝改変による医薬品原料プロトカテク酸の発酵高生産
○小暮 高久[1]，須田 雅子[1]，平賀 和三[1]，乾 将行[1,2]　([1]RITE，[2]奈良先端大・バイオ)

2C06-13　大腸菌を宿主とした電子分岐型 [FeFe] ヒドロゲナーゼの異種発現と水素生産
○清水 哲[1]，寺本 陽彦[1]，乾 将行[1,2]　([1]RITE，[2]奈良先端大・バイオ)

2C06-14　エチレングリコール資化性菌の探索と代謝機構の解析
○鈴木 快[1,2]，清水 哲[2]，乾 将行[1,2]　([1]奈良先端大・バイオ，[2]RITE)

2C06-15　組換え *Ralstonia eutropha* によるポリヒドロキシアルカン酸ブロック共重合体の生合成
○石原 静流[1]，折田 和泉[1]，松本 謙一郎[2]，福居 俊昭[1]　([1]東工大生命理工，[2]北大院工)

2C06-16　メタノール資化性菌内での C_1 化合物資化代替経路の構築
○折田 和泉[1]，平林 翼[1]，新田 克章[2]，福崎 英一郎[2]，福居 俊昭[1]　([1]東工大生命理工，[2]阪大院工)

2C06-17　水素細菌およびメチロトローフにおける転写制御スイッチの確立
○福居 俊昭[1]，平山 歩夢[1]，折田 和泉[1]，梅野 太輔[2]　([1]東工大生命理工，[2]千葉大院工)

ミーティングルームD 質疑応答コアタイム 9:30～10:00

食品―食品機能・栄養 - 免疫，炎症 / 食品機能・栄養 - 脂質代謝，糖質代謝 / 食品機能・栄養 - 消化・吸収，循環・血管 / 食品機能・栄養 - その他―

2D02-01　ガレート型プロシアニジンによる IL-17 産生抑制メカニズムの解析
○遠藤 勝紀，澤 陶有子，田中 佑奈，浅見 拓哉，松井 莉奈，真壁 秀文，田中 沙智　（信州大学）

2D02-02　マンノオリゴ糖による樹状細胞活性化機構に関する解析
○鄭 廷宇[1]，LIN Yen-Ju[2]，佐分利 亘[3]，SCHUELKE Stefan[2]，戸田 雅子[1]　([1]東北大院農，[2]The Paul-Ehrlich-Institut，[3]北大院農)

2D02-03　緑茶カテキン EGCG は骨髄性細胞の 67LR を介して肥満誘発性炎症および脂肪蓄積を抑制する
○冨岡 玲乃，西岡 成汰，小原井 春香，村田 京介，福富 拓哉，山田 脩平，熊添 基文，藤村 由紀，立花 宏文　（九大院農院・生機科）

2D02-04　腸管 M 細胞透過性を有する食品由来多糖の探索
○近澤 未歩，湊 健一郎　（名城大農）

2D02-05　ヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞の特性と食品機能解析への応用
○今倉 悠貴[1]，美馬 伸治[1]，山﨑 奈穂[1]，岩尾 岳洋[2]，松永 民秀[2]，永田 幸三[1]，谷口 雅彦[1]　([1]富士フイルム株式会社，[2]名市大薬)

2D02-06　*Lactobacillus paracasei* K71 の経口摂取によるスギ花粉アレルギー症状の緩和効果
○三原 敏敬[1]，畑 実里[2]，吉澤 梓織[2]，山本 佳奈[1]，杉本 淑惠[1]，内山 公子[1]，城 斗志夫[2]，原 崇[2]　([1]亀田製菓，[2]新潟大農)

2D02-07　ウーロン茶ポリフェノールの腸管上皮細胞における miRNA 発現調節作用とその機能
○楊 琳云，林 庭安，丸亀 裕貴，藤村 由紀，立花 宏文　（九大院農院・生機科）

2D02-08　25-hydroxycholesterol は肝細胞における飽和脂肪酸毒性を増強させる
○有澤 琴子[1]，山田 安香音[2]，岸本 真弥[2]，藤原 葉子[3,4]，市 育代[3,4]　([1]お茶大・食物，[2]お茶大院・ライフ，[3]お茶大・基幹研究院，[4]お茶大・HLI研)

2D02-09　フコースがマウス脂肪細胞のトランスクリプトームに及ぼす影響
○中尾 友彦[1]，小南 友里[1]，苑 暁[1]，潮 秀樹[1]，伊東 美保[2]，相澤 光輝[2]，久保村 大樹[2]，赤堀 雄介[2]　([1]東大院農，[2]焼津水産化学工業(株))

2D02-10　エゾウコギの骨格筋エネルギー代謝，脂肪細胞の脂質代謝および持久性運動能力への影響
○小野 夏彦[1]，瓜生 圭介[1]，丸 勇史[1]，吉川 万紀[2]，岡田 陽子[2]，橋本 健志[2]　([1]備前化成，[2]立命館大)

2D02-11　香辛料 Grains of Paradise に含まれるバニロイド成分の抗肥満活性
○服部 浩之[1,2]，森 崇[3]，柴田 貴広[2]，北 将樹[2]，光永 徹[3]　([1]名大ASCI，[2]名大院生命農，[3]岐大応生)

2D02-12　8- プレニルナリンゲニンの肥満抑制効果
○山田 詩奈[1]，中島 賢則[2]，卯川 裕一[2]，大江 健一[2]，向井 理恵[3]，芦田 均[1]，山下 陽子[1]　([1]神戸大院・農，[2]ダイセル(株)，[3]徳島大院・社会産業理工)

2D02-13　Chemical, microbial and functional properties of amazake fermented with different kefir grains
○GAMBA Raul Ricardo，OYA Rina，UMEDA Memi，KOYANAGI Takashi，ENOMOTO Toshiki　(Department of Food Science (Ishikawa Prefectural University))

2D02-14　5- ヒドロキシ -7- メトキシフラボンによる GPR97 活性化機構の解明
○前川 大輔，原田 直樹，山地 亮一　（大阪府大院・生命環境）

2D02-15　ヒト表皮角化細胞において *Lactobacillus crispatus* KT-11 が皮膚バリア機能に及ぼす影響
○星 芙美香，渡邉 樹　（株式会社キティー）

2D02-16　ウコン属植物ガジュツ(*Curcuma zedoaria*)の糖質分解酵素阻害活性
○山崎 一諒，細川 敬三　（兵庫大学健康科学）

ミーティングルームD 質疑応答コアタイム 10:30～11:00

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

2D04-01　T 細胞依存性の異なる腸管粘膜 IgA に食品が及ぼす影響の解析
○後藤 真生，若木 学，石川(高野) 祐子　（農研機構食品研究部門）

2D04-02　マウス RAW264.7 細胞において発現している苦味受容体の機能解析
○平原 結奈，大泉 由佳，大崎 雄介，駒井 三千夫，白川 仁　（東北大・院農・栄養学）

2D04-03　ビオチンが腸管免疫系の細胞応答に与える影響
○池田 大貴，岡田 開，古川 凱斗，増山 大雅，竹ノ内 優介，川上 里奈，加藤 仁美，津田 真人，細野 朗　（日大生資科）

2D04-04　プロピオン酸は腸管上皮 Caco-2 細胞の内皮細胞選択的接着分子の発現を高める
○諫山 佳奈，山本 祥也，鈴木 卓弥　（広島大院　統合生命）

2D04-05　γ-リノレン酸の乳酸菌代謝物であるγ KetoC は NRF2 活性化を介して免疫抑制作用を発揮する
○八代 拓也[1]，山本 愛日[1]，飯田 真由[1]，大村 さくら[1]，市原 学[2]，岸野 重信[3]，小川 順[3]，西山 千春[1]　([1]東理大基礎工，[2]東理大薬，[3]京大院農)

2D04-06　漬物由来乳酸菌による IL-12 発現制御の解析
○柴田 奈那[1]，日浦 月穂[1]，村田 美樹[2]，浅見 進也[2]，薩 秀夫[3]　([1]前橋工大院工，[2](株)新進・総合研究所，[3]前橋工大工)

2D04-07　*Lactobacillus plantarum*06CC2 摂取による高尿酸血症マウスにおける尿酸排泄系トランスポーターの発現増加効果
○川久保 響[1]，岩切 明日夏[1]，宮本 侑子[1]，後藤 聡太[1]，小川 健二郎[2]，西山 和夫[1]，Tsend-Ayush Chuluunbat[3]，Oyunsuren Tsendesuren[4]，李 怡然[5]，中野 智木[5]，竹下 正彦[5]，有馬 勇夫[5]，山崎 正夫[1]　([1]宮崎大応生，[2]宮崎大TT推進機構，[3]蒙科技大，[4]蒙バイオ協会，[5]南日本酪農協同(株))

2D04-08　*Lactobacillus plantarum* 06CC2 摂取による高脂肪食マウスの腸管バリア調節作用
○市谷 花帆[1]，宮本 侑子[1]，小野 江梨花[1]，小川 健二郎[2]，西山 和夫[1]，Tsend-Ayush Chuluunbat[3]，Oyunsuren Tsendesuren[4]，李 怡然[5]，中野 智木[5]，竹下 正彦[5]，有馬 勇夫[5]，山崎 正夫[1]　([1]宮崎大農応生，[2]宮崎大TT推進機構，[3]蒙科技大，[4]蒙バイオ協会，[5]南日本酪農協同(株))

2D04-09　*Lactobacillus plantarum* 06CC2 摂取による肝臓コレステロール低下作用と胆汁酸脱抱合調節作用
○山崎 正夫[1]，峯崎 美歌子[1]，岩切 明日夏[1]，宮本 侑子[1]，小川 健二郎[2]，西山 和夫[1]，Tsend-Ayush Chuluunbat[3]，Oyunsuren Tsendesuren[4]，李 怡然[5]，中野 智木[5]，竹下 正彦[5]，有馬 勇夫[5]　([1]宮崎大農応生，[2]宮崎大TT推進機構，[3]蒙科技大，[4]蒙バイオ協会，[5]南日本酪農協同(株))

2D04-10　アシル化フラボノール配糖体の細胞内中性脂肪低減作用
○長友 暁史[1,2]，河野 麻実子[1]，川上 宏智[1]，二宮 清文[2,3]，森川 敏生[2,3]　([1]森下仁丹(株)，[2]近畿大薬総研，[3]近畿大アンチエイジングセ)

2D04-11　ヒト腸内細菌叢培養モデルの小型化
石川 愛花，○稲垣 瑞穂　（岐阜大応生）

2D04-12　未消化コーヒー焙煎豆の機能性
○武井 実花，TATIYANUKUL Chalinee，田中 航，榊原 啓之　(宮崎大農)

2D04-13　α-EG 食事試験によるコラーゲンスコアへの影響
○中嶋 唯人[1]，柳田 茉子[2]，宮島 誠治[3]，尾関 健二[1,2]　([1]金沢工業大学，[2]金沢工業大学　大学院，[3]米沢電気工事株式会社)

2D04-14　AhR の活性化による肝臓の脂質蓄積における時計遺伝子の関与とフラボノイドによる抑制効果
○北風 智也，野村 拓也，芦田 均　（神戸大院・農）

2D04-15　フルクトオリゴ糖摂取ラットの大腸 ALP 活性誘導をはじめとする腸内環境変動に対する脂肪摂取量の影響
○岡崎 由佳子，尾崎 舞，鈴木 毬那，東海林 綾香　（藤女子大人間生活）

ミーティングルームD 質疑応答コアタイム 13:30～14:00

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

2D07-01　高圧酵素処理肉エキスにおける機能性成分簡易分析法の検討
○小木曽 加奈[1]，古田 一匡[2]　([1]長野県立大健康発達，[2]富士通株式会社)

2D07-02　乾熱処理脱脂粉乳の酸ゲル化能について
○小野 航[1]，岡 大貴[2]，辻井 良政[2]，野口 智弘[1]，髙野 克己[2]　([1]東京農大応生・食加技セ，[2]東京農大応生・農化)

2D07-03　乳化イサダオイル噴霧乾燥粉末中のエイコサペンタエン酸，およびドコサヘキサエン酸の安定性
フェルミン アントニオ[1]，高重 至成[1]，アフロザ スルタナ[1]，安達 修二[2]，○吉井 英文[3]　([1]香大農，[2]京都先端大，[3]摂大農)

2D07-04　亜臨界水中での希少糖の合成に及ぼす緩衝液とアルコールの影響
○尾西 佑一朗[1]，古城 侑也[1]，安達 修二[2]，谷 史人[1]，小林 敬[1]　([1]京都大院農，[2]京都先端科学大)

2D07-05　高圧熱水処理によるタンパク質の部分分解反応の速度論的解析
○布川 真帆[1]，石川 大太郎[2]，藤井 智幸[1]　([1]東北大農，[2]福島大農)

2D07-06　フード3D プリンタと AI を活用した次世代食感分析法と製造方法開発
○武政 誠，清水 純平　（東京電機大）

2D07-07　フード3D プリンタで作り込む不均一構造により食感を創出する
○清水 純平，武政 誠　（東京電機大）

2D07-08　フード3D プリンタ向けフードインクに求められるレオロジー特性
○渡邊 健太，清水 純平，武政 誠　（東京電機大学）

2D07-09　モデル舌で圧縮したやわらかいジェランガムゲルの変形解析
○神山 かおる[1]，石原 清香[2]，中馬 誠[2]，船見 孝博[2]　([1]農研機構食品研究部門，[2]三栄源エフ・エフ・アイ)

2D07-10　グルコノデルタラクトン存在下でのカゼインナトリウム・オボアルブミン混合タンパク質ゲルのゲル化特性とそのネットワーク構造
○太田 尚子[1]，下ノ村 直哉[1]，星 宥伽[1]，レオマック マチュー[2]，堀 孝一[3]，太田 啓之[3]　([1]日本大学短期大学部，[2]リヨン大学，[3]東京工業大学生命理工学院)

2D07-11　ラボ SAXS 装置による凝乳過程におけるコロイド状リン酸カルシウム(CCP)の時間変化の定点観察
○大沼 正人[1]，那須田 祐子[1]，阿部 勇魚[1]，河野 剛[2]，山住 弘[2]　([1]北大工，[2]雪印メグミルク(株)ミルクサイエンス研究所)

2D07-12　新規ガス分析装置(IMS)を用いたヨーグルト発酵過程のモニタリング
○松尾 俊輔[1]，鴻丸 翔平[1]，種田 明子[2]，岩松 正[1]，根岸 晴夫[2]　([1]シャープ株式会社，[2]中部大学　応用生物)

2D07-13　低苦味価ビールにおけるグラム陽性芽胞菌の増殖性評価
○町田 賢司，蛸井 潔，金子 剛　（サッポロビール株式会社）

ミーティングルームE 質疑応答コアタイム 9:00～9:30

食品―食品機能・栄養 - 免疫，炎症 / 食品機能・栄養 - 脂質代謝，糖質代謝 / 食品機能・栄養 - タンパク質・アミノ酸代謝―

2E01-01　自己免疫疾患シェーグレン症候群の涙液分泌機能低下に及ぼすブルーベリー葉エキスの作用
○浦田 果林[1]，前田 咲[1]，小川 健二郎[2]，大野 雄太[4]，佐藤 慶太郎[5]，山崎 正夫[1]，西山 和夫[1]，後藤 陽[3]，中山 貴之[3]　([1]宮崎大農，[2]宮崎大テニュアトラック，[3]ビオラボ，[4]朝日大歯，[5]明海大歯)

2E01-02　シソ葉香気成分ペリルアルデヒドは樹状細胞における炎症性サイトカインの発現を抑制し，皮膚炎を改善する
○岡田 光，八代 拓也，西山 千春　（東理大）

2E01-03　*Lactobacillus plantarum* LOC1 による IL-12 発現誘導の作用機序の解析
○日浦 月穂[1]，鈴木 政彦[2]，本田 瑞希[1]，辻川 勇治[2]，坂根 巌[2]，薩 秀夫[3]　([1]前橋工大院工，[2](株)伊藤園・中央研究所，[3]前橋工大工)

2E01-04　乳酸菌 RNA が $CD4^+$ T 細胞の増殖および IL-2 産生に与える影響
○谷田貝 円[1]，青木 玲二[2]，大久保 愛実[3]，正田 紗弓[3]，宮本 真緒[3]，御林 碧波[3]，平井 智美[3]，川澄 俊之[1,3]，青木 綾子[3]　([1]日本女子大院・家政，[2]農研機構・畜産研，[3]日本女子大・食物)

2E01-05　ブルーベリー素材が自己免疫疾患シェーグレン症候群モデル動物の唾液分泌量に及ぼす影響
○小川 健二郎[1]，前田 咲[2]，浦田 果林[2]，佐藤 慶太郎[3]，大野 雄太[4]，山﨑 正夫[2]，西山 和夫[2]　([1]宮崎大テニュアトラック，[2]宮崎大農，[3]明海大歯，[4]朝日大歯)

2E01-06　樹状細胞の TLR7 シグナルに対するガレート型プロシアニジンの影響
○澤 陶有子，遠藤 勝紀，田中 佑奈，真壁 秀文，田中 沙智　（信州大農）

2E01-07　マウスにおけるα G ナリンジンの抗肥満作用
○松本 敦子[1]，長田 恭一[2]，橋爪 雄志[3]，タンジャ マハマドゥ[3]　([1]明治大院農，[2]明治大農，[3]東洋精糖(株))

2E01-08　ゲニステインはミトコンドリア標的分子を介して脂質蓄積を制御する
○三谷 塁一，池田 貴弘，渡邉 駿　（信大院総合理工(農学)）

2E01-09　熊野市特産柑橘『新姫』果皮抽出エキスの抗肥満効果
○渡辺 章夫[1,5]，米澤 貴之[1]，深尾 弦貴[3]，渡邉 晴奈[2]，中村 太郎[2]，山野 亜紀[4]，照屋 俊明[4]，禹 済泰[2]　([1]中部大・生機研，[2]中部大院・応生，[3]中部大・応生，[4]琉球大院・理工，[5]十文字女子大・食開)

2E01-10　ガーリック由来香気成分が高脂肪食給餌ラットの脂肪酸合成に及ぼす影響
○阿部 真理奈[1]，渡辺 高大[1]，三浦 徳[2]，増澤 (尾﨑) 依[3]，細野 崇[1,3]，関 泰一郎[1,2,3]　([1]日大院・生資科・応生科，[2]日大・生資科・総合研究所，[3]日大・生資科・生命化)

2E01-11　7-ketocholesterol が骨格筋のインスリン伝達経路にもたらす影響
○小鳥井 あおい[1]，柳本 彩[1]，飯島 佳奈[1]，藤原 葉子[2,3]，市 育代[2,3]　([1]お茶大院・ライフ，[2]お茶大・基幹研究院，[3]お茶大・HLI研)

2E01-12　脂質代謝改善ペプチド IIAEK(ラクトスタチン)は脂質代謝改善に寄与する腸アルカリフォスファターゼ(IAP)を標的とし，IAP の特異的な活性化及び ABCA1 の下方調節を伴ってコレステロール代謝を改善する
○竹内 朝陽[1]，久松 賢太郎[1]，奥村 菜月[1]，杉光 祐紀[1]，柳瀬 笑子[2]，上野 義仁[2]，長岡 利[1]　([1]岐阜大応生食品分子機能学，[2]岐阜大応生生物有機化学)

2E01-13　プロバイオティクスとバランス良い栄養素を配合したプロテイン摂取による効率的な筋肉増量効果と腸内細菌叢の改善
○鈴木 基生[1]，冨士川 凛太郎[1]，世良 泰[2]，鈴木 啓太[1]　([1]AuB株式会社，[2]慶應義塾大学　医学部　スポーツ医学総合センター)

2E01-14　スピルリナ摂取ラットにおけるタンパク質消化吸収・生体利用解析
○小林 琢磨[1]，塩地 雄大[1,2]，吉田 卓矢[1,3]，小田切 友佳[3]，笹田 達也[2]，三好 規之[1,3]　([1]静県大院薬食，[2]ビューテック株式会社　掛川バイオセンター，[3]静県大食品栄養)

ミーティングルームE 質疑応答コアタイム 10:00～10:30

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

2E03-01　*Bifidobacterium breve* N708 株の IL-10 産生誘導能およびその作用機序の解析
○伊木 明美，砂田 洋介，大木 篤史，田辺 創一　（日清食品HD(株)グローバルイノベーション研究センター）

2E03-02　野沢菜由来多糖による免疫賦活作用を介した抗腫瘍効果の解析
○田中 沙智[1]，松井 莉奈[1]，片山 茂[1]，北村 秀光[2]　([1]信州大農，[2]北大遺制研)

2E03-03　酸化コレステロールが樹状細胞の分化と活性化に与える影響の解析
○柳沢 林太郎[1]，浅井 明[2]，戸田 雅子[1]　([1]東北大農，[2]未来科学技術共同研究センター)

2E03-04　酸化型ビタミン C 修飾タンパク質とヒストン H2B の相互作用メカニズムの解明
○板倉 正典[1]，山口 公輔[1]，佐々木 栄太[1]，吉武 淳[2]，柴田 貴広[3]，大野 礼一[4]，永井 竜児[4]，内田 浩二[1]　([1]東大院農生科，[2]名大未来社会，[3]名大院生命農，[4]東海大農)

2E03-05　ポリフェノール修飾タンパク質によるヒストン結合を介した細胞保護作用
○山口 公輔[1]，板倉 正典[1]，佐々木 栄太[1]，赤川 貢[2]，内田 浩二[1]　([1]東大院農生科，[2]大阪府立大学大学院・生命環境科学研究科)

2E03-06　高齢マウスに及ぼす食品コウジカビの経口投与による Th1 応答増強効果
○吉澤 昂史[1]，内田 妃音[1]，石塚 悠有[1]，宇田 佳功[1]，関口 昭博[2]，榎本 淳[1,3]　([1]群大院理工，[2]群馬産技セ，[3]群大食健康セ)

2E03-07　SFaN による前駆体 SREBP 分解促進作用の解析
○菊地 瑛登[1]，松永 優輝[2]，小髙 愛未[2]，正路 健太[1]，宮田 慎吾[3]，石神 健[4]，松本 雄宇[2]，鈴木 司[2]，山本 祐司[1,2]，佐藤 隆一郎[3]，井上 順[1,2]　([1]東農大院・応生科・農化，[2]東農大・応生科・農化，[3]東大院・農生科・応生化，[4]東農大・生命科)

2E03-08　スルフォラファンの新規結合分子の探索
○小髙 愛未[1]，菊地 瑛登[2]，正路 健太[2]，石神 健[3]，松本 雄宇[1]，鈴木 司[1]，山本 祐司[1,2]，井上 順[1,2]　([1]東農大・応生科・農化，[2]東農大院・応生科・農化，[3]東農大・生命科)

2E03-09　尿酸排出トランスポーター ABCG2 を活性化するフィトケミカルの探索・解析
○榎本 泰大[1]，近藤 泰嗣[2]，豊田 優[3]，鈴木 洋史[3]，高田 龍平[3]，薩 秀夫[2]　([1]前橋工大院工，[2]前橋工大工，[3]東大病院薬剤部)

2E03-10　関節固定による筋萎縮時の脂質代謝動態
○木村 圭佑[1]，森笹 瑞季[1]，水重 貴文[2]，蕪山 由己人[2]，早坂 孝宏[3]，吉田 恵里子[4]，内田 健志[4]，森 司[1]，井上 菜穂子[1]　([1]日本大学，[2]宇都宮大学，[3]北海道大学，[4]日本水産(株))

2E03-11　不運動・軽運動モデルに対する魚肉タンパク質の効果の検証
○森笹 瑞季[1]，木村 圭佑[1]，水重 貴文[2]，蕪山 由己人[2]，内田 健志[3]，吉田 恵里子[3]，森 司[1]，井上 菜穂子[1]　([1]日本大学大学院，[2]宇都宮大学，[3]日本水産(株))

2E03-12　小型ハクジラ類 5 種の可食部における栄養成分特性
○船坂 徳子[1]，伊藤 智広[1]，吉岡 基[1]，田中 清仁[2]，貝 良文[3]　([1]三重大院生資，[2]太地いさな組合，[3]太地町漁協)

2E03-13　Lipids prepared from blubber of Risso's dolphin (*Grampus griseus*) attenuates lipopolysaccharide and interferon gamma co-stimulated nitric oxide production in murine macrophage RAW264.7 cells.
○ITOH Tomohiro[1]，FUNASAKA Noriko[1]，YOSHIOKA Motoi[1]，TANAKA Kiyohito[2]，KAI Yoshifumi[3]　([1]Grad. Sch. Biores., Mie Univ.，[2]Taiji Isana Association，[3]Taiji Fishery Cooperative Union)

2E03-14　自然薯ムカゴ摂取の代謝に対する影響
○篠崎 文夏[1]，亀井 飛鳥[1]，嶋田 耕育[1]，荒井 綜一[1,2]，阿部 啓子[1,3]
([1]KISTEC，[2]東農大総研，[3]東大院農)

2E03-15　ユコウ果皮に含まれるポリメトキシフラボノイド類の抗真菌活性の検討
○佐藤 萌[1]，大西 康太[1]，新居 美香[1,2]，黒田 雅士[1]，堤 理恵[1]，
阪上 浩[1]　([1]徳島大栄，[2]徳農技セ)

2E03-16　ユーグレナによる腸内細菌叢の調整に関する研究
○中島 綾香[1]，佐々木 建吾[2]，佐々木 大介[2]，鈴木 健吾[1]，
近藤 昭彦[2,3]　([1]株式会社ユーグレナ，[2]神戸大学，[3]理研CSRS)

ミーティングルームE 質疑応答コアタイム 11:00～11:30

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

2E05-01　ウロン酸組成，タンパク質含有量，アルギン酸関連酵素活性のコンブ部位比較
○平賀 捷悟[1]，川又 澄人[2]，四ツ倉 典滋[3]，垣田 浩孝[1,2]　([1]日大院総合基，[2]日大文理，[3]北方生物圏フィールド科学センター)

2E05-02　日本人の母乳に含まれるシアル酸とオリゴ糖の泌乳期変化
○辻森 祐太[1]，福留 博文[2]，樋口 淳一[2]，高橋 朋樹[1]，上野 宏[1]，
山口 敏幸[2]，酒井 史彦[2]，鳥羽 保宏[1]　([1]雪印ビーンスターク(株)商品開発部，[2]雪印メグミルク(株)ミルクサイエンス研究所)

2E05-03　エンドウペクチンの構造と酸性乳飲料安定化能との相関
○東 ほたる[1]，野口 美咲[1]，中澤 昌美[1]，上田 光宏[1]，山田 浩之[2]，
福原 宏章[3]，シャカットプラカート ソンボン[4]，福井 健介[3]，
長谷川 芳則[3]，阪本 龍司[1]　([1]大阪府大院・生命環境科学，[2]大関(株)，[3]不二製油(株)，[4]不二製油グループ本社(株))

2E05-04　アーモンドオイルの網羅的な脂肪酸分析および機能性脂質の探索
○宅見 央子，加藤 和子，釜阪 寛，栗木 隆　(江崎グリコ株式会社)

2E05-05　光酸化を踏まえたリノール酸およびリノレン酸からのアクロレイン生成経路の解明
○加藤 俊治[1]，清水 直紀[2]，乙木 百合香[2]，伊藤 隼哉[2]，
境野 眞善[2,3]，佐野 貴士[3]，竹内 茂雄[3]，今義 潤[1,3]，仲川 清隆[1,2]
([1]東北大院農・J-オイルミルズ油脂イノベーション共同研究講座，[2]東北大院農・機能分子解析学，[3](株)J-オイルミルズ)

2E05-06　加工食品(ポテトチップス)の保存時に進行する脂質酸化とその機構の評価
○山田 皓輝[1]，伊藤 隼哉[1]，加藤 俊治[1]，石原 克之[2]，国寄 祐子[2]，
仲川 清隆[1]　([1]東北大院農・機能分子解析学，[2]カルビー株式会社)

2E05-07　メチルエステル化度の異なるペクチンとの複合体化によるβ - ラクトグロブリンの高機能化
○加藤 七菜子，好田 正，服部 誠　(東農工大農)

2E05-08　カルボキシメチルセルロースとの複合体化によるβ - コングリシニンの高機能化
○田中 綾，溝渕 響子，好田 正，服部 誠　(東農工大)

2E05-09　メイラード反応を利用したペクチンとの複合体化によるβ - コングリシニンの高機能化
○根上 拓，西山 まなみ，好田 正，服部 誠　(東農工大)

2E05-10　オボアルブミンおよびその他卵白タンパク質の加熱ゲル形成への寄与
○小山 翔大[1,2]，辻井 良政[2,3]，高野 克己[3]，半田 明弘[2,4]　([1]東京農大院応生，[2]東京農大キユーピーエッグイノベーション，[3]東京農大応生農化，[4]キユーピー(株))

2E05-11　大豆乾燥ストレスタンパク質・デハイドリンが豆腐カード形成能に及ぼす影響
○瀬崎 真由[1]，岡 大貴[2]，高野 克己[2]，辻井 良政[2]　([1]東京農大院応生，[2]東京農大応生農化)

2E05-12　梨幼果抽出成分による出芽酵母の寿命延伸効果と有効成分の検討
○村田 和加恵[1,2]，藤井 雄三[1]，藤田 憲一[2]，山口 良弘[2]，
田中 俊雄[2,3]，荻田 亮[2,3]　([1]米子高専，[2]阪市大院・理，[3]阪市大・健康研セ)

2E05-13　LC-MS を用いた紅茶製造時における成分変化に関する網羅的解析
○伊藤 歩未[1]，柳瀬 笑子[1,2]　([1]岐阜大院自然科技，[2]岐阜大応生)

2E05-14　インゲンマメ多糖類の乳化性と乳化機構の解析
○酒井 円香[1]，西山 節子[2]，木田 晴康[2]，中村 彰宏[1]　([1]茨城大学，[2]不二製油グループ本社)

2E05-15　チーズ中の環状ジペプチド生成に対する熟成工程の影響
○大塚 祐季[1]，阪地 満帆[1]，柏木 丈拡[1]，島村 智子[1]，受田 浩之[2]
([1]高知大・農，[2]高知大・地域創造セ)

2E05-16　低酸性条件下でのコーヒーの殺菌活性ならびに焙煎が活性に及ぼす影響
○井上 葵[1]，五十嵐 朱里[1]，筒浦 さとみ[2]，村田 容常[1]　([1]お茶の水女子大学，[2]新潟大学)

2E05-17　北海道で製造されたドライ熟成肉における真菌類の分布と香りに与える影響
○三上 奈々[1]，豊留 孝仁[2,3,4]，田村 健一[5]，山代 佳孝[1]，
須合 胡夕紀[1]，吉冨 琴音[1]，高谷 政宏[6]，韓 圭鎬[1]，福島 道広[1]，
島田 謙一郎[1]　([1]帯畜大・畜産，[2]帯畜大・獣医，[3]帯畜大・動物・食品検査診断センター，[4]千葉大・真菌医学研究センター，[5]北一ミート(株)，[6]とかち財団)

ミーティングルームE 質疑応答コアタイム 13:00～13:30

食品―食品化学 - 糖質，脂質 / 食品化学 - タンパク質，アミノ酸 / 食品化学 - 色素，香料 / 食品化学 - その他 / 食品機能・栄養 - 酸化，抗酸化，糖化，抗糖化，老化―

2E06-01　環状四糖(CNN)水あめの調製法の検討
○安田 亜希子，宮田 学，山本 拓生，阿賀 創，山本 晃隆　(株式会社 林原)

2E06-02　環状四糖(CNN)水あめの工業スケールでの調製とその構造および基礎物性
○川内 優輝，安田 亜希子，宮田 学，国吉 三枝子，大河内 歩，
佐能 吏，吉田 憲史，山本 拓生，阿賀 創，山本 晃隆　(株式会社 林原)

2E06-03　環状四糖(CNN)水あめの諸性質と下痢に対する最大無作用量
○櫻井 岳夫，安田 亜希子，黒瀬 真弓，小川 亨，定清 剛，
国吉 三枝子，大河内 歩，佐能 吏，吉田 憲史，山本 拓生，
遠藤 伸，阿賀 創，三皷 仁志，山本 晃隆　(株式会社 林原)

2E06-04　リノール酸ヒドロペルオキシド異性体から生じる酸化二次生成物の解析
○宮崎 瑠璃子[1]，加藤 俊治[2]，境野 眞善[1,3]，竹内 茂雄[3]，
今義 潤[2,3]，仲川 清隆[1,2]　([1]東北大院農・機能分子解析学，[2]東北大院農・J-オイルミルズ油脂イノベーション共同研究講座，[3](株)J-オイルミルズ)

2E06-05　イオンモビリティー質量分析を用いた酵素による脂質過酸化の評価
○伊藤 隼哉[1]，清水 直紀[1]，加藤 俊治[1]，花田 篤志[2]，前川 正充[3]，
仲川 清隆[1]　([1]東北大院農・機能分子解析学，[2]株式会社エービー・サイエックス，[3]東北大病薬)

2E06-06　米糠アルブミンの効率的な抽出法の確立とその食後血糖値上昇抑制作用の検討
○小川 里桜[1]，杉本 千晶[2]，小谷 純[2]，稲 成信[2]，二宮 和美[1]，
山口 勇将[2]，熊谷 仁[1]，熊谷 日登美[2]　([1]共立女子，[2]日大・生資科)

2E06-07　オリーブ抽出物によるカキアレルゲンタンパク質の低アレルゲン化
○菰田 俊一，山口 春菜，赤澤 隆志　(宮城大　食産業)

2E06-08　アゴニスト構造を元に見出したヒト苦味・甘味受容体共阻害ペプチド
○尾城 一恵[1]，西尾 洋美[1]，伊藤 豊実[1]，豊原 良和[2]，平本 忠浩[2]，寺田 祐子[1]，伊藤 圭祐[1]　([1]静県大院・薬食，[2]高砂香料工業)

2E06-09　抗腫瘍性ルナシンの生成に関わる大豆成分の同定と生成機構の解明
○小川 智久[1,2]，大泉 結帆[2]，平垣内 一子[2]，田中 良和[2]，村本 光二[2]　([1]東北大院農，[2]東北大院生命)

2E06-10　加熱殺菌による起泡性低下要因の探索
○中根 和可奈[1,2]，小山 翔太[1,2]，辻井 良政[2,3]，高野 克己[3]，半田 明弘[2,4]　([1]東京農大院応生，[2]東京農大キユーピーエッグイノベーション，[3]東京農大応生農化，[4]キユーピー(株))

2E06-11　超高速 GC による醤油の香気特性評価と官能評価点数との相関
○白土 遥菜[1]，渡邉 聡美[1]，脇山 元気[2]，植木 達朗[2]，小林 弘司[1]，石川 洋哉[1]　([1]福女大，[2]福岡醤油醸造組合)

2E06-12　緑藻類スジアオノリのβ－カロテン含有量と水温によるその変動
○谷山 友規[1]，團 昭紀[2]，垣田 浩孝[1]　([1]日大院総合基，[2]徳島大学産業院)

2E06-13　ゲル濾過高速液体クロマトグラフィーによるクチナシ青色素の分子量測定法の検討
○米山 弥也子[1]，辻井 良政[2]，高野 克己[2]　([1]東京農大院・農化，[2]東京農大応生・農化)

2E06-14　溶液喫飲後の口腔内呈味成分経時測定法
○中田 勇二，辻 史忠，林 和寛　(味の素(株))

2E06-15　摘果柿を利用した“高齢者用食品”－エマルジョンを用いたシトラールの劣化抑制効果－
○吉岡 佐知子[1]，大西 夏実[2]，楠戸 邦弘[1]，和田 瑞彩[1]，渡邉 義之[3]，菅野 憲一[4]，野村 正人[3]，澤邊 昭義[1,2]　([1]近畿大農，[2]近畿大院農，[3]近畿大工，[4]近畿大産理工)

2E06-16　国産メロン 20 品種の香気プロファイリング
○田中 福代[1]，大寺 宇織[2]，八城 和敏[2,4]，葛谷 真輝[2]，瀬角 美穂[3]，中野 優子[3]，早川 文代[3]　([1]農研機構中央農研，[2]茨城農総セ生工研，[3]農研機構食品部門，[4]茨城県筑西地域農業改良普及センター)

2E06-17　生産地および保存温度の違いが白カビ熟成チーズの成分プロファイルに与える影響
○佐藤 実穂，海野 良輔，鈴木 敏弘，石川 森夫　(東農大院・醸造)

2E06-18　コシヒカリ交雑体 91 系統の米飯物性特性の検討
○早川 椋太[1]，堀 清純[2]，髙野 克己[3]，辻井 良政[3]　([1]東京農大院応生，[2]農研機構，[3]東京農大応生農化)

2E06-19　フェルラ酸の焙煎反応物の化学構造(ポリフェノール関連物質の焙煎化学)
○新道 雪乃，唐津 明日香，増田 俊哉　(大阪市大院生活)

2E06-20　クロカワ(食用キノコ)に含まれる抗酸化活性物質に関する研究 I. 活性物質の単離精製および化学構造解析
○萩原 萌，及川 絢，佐藤 咲，佐藤 美穂，澤 菜月，西澤 ひなた，酒見 裕香，新藤 一敏　(日女大・家政・食物)

2E06-21　クロカワ(食用キノコ)に含まれる抗酸化活性物質に関する研究 II. 活性物質の抗酸化活性評価及び加熱調理による変化
○酒見 裕香，萩原 萌，及川 絢，佐藤 咲，佐藤 美穂，澤 菜月，西澤 ひなた，新藤 一敏　(日女大・家政・食物)

ミーティングルームF　質疑応答コアタイム 9:30～10:00

有機化学，天然物化学―天然物 - 単離構造決定 - 動物，植物 / 天然物 - 生合成 / 合成，反応機構―

2F02-01　コムラサキシメジ菌糸体培養濾液由来の植物成長調節物質の探索
○住田 真晟[1]，呉 静[2]，崔 宰熏[1,2,3]，伊藤 彰将[3,4]，平井 浩文[1,2,3]，河岸 洋和[1,2,3]　([1]静大院・総合農，[2]静大院・グリーン研，[3]静大院・創造，[4]JSPS)

2F02-02　白きょう病菌(*Beauveria bassiana*)由来の生物活性物質の探索
○王 俊紅[1]，日比 琢斗[1]，呉 静[2]，崔 宰熏[1,2,3]，道羅 英夫[2]，平井 浩文[1,2,3]，河岸 洋和[1,2,3]　([1]静大院・総合農，[2]静大・グリーン研，[3]静大院・創造)

2F02-03　ニンギョウタケ(*Albatrellus confluens*)子実体由来の生物活性物質の探索
○下崎 康平[1]，呉 静[2]，崔 宰熏[1,2,3]，平井 浩文[1,2,3]，河岸 洋和[1,2,3]　([1]静大農・応生科，[2]静大・グリーン研，[3]静大院・創造)

2F02-04　シロオニタケ子実体由来の生体機能性物質の探索
○小椋 隆平[1]，上石 優作[1]，呉 静[2]，近藤 満[2,3]，崔 宰熏[1,2,3]，平井 浩文[1,2,3]，河岸 洋和[1,2,3]　([1]静大院・総合農，[2]静大・グリーン研，[3]静大院・創造)

2F02-05　シイタケの fruiting liquid(FL)由来の機能性物質の探索
○横堀 沙英[1]，呉 静[2]，近藤 満[2,3]，深山 陽一朗[4]，崔 宰熏[1,2,3]，平井 浩文[1,2,3]，河岸 洋和[1,2,3]　([1]静大院・総合農，[2]静大・グリーン研，[3]静大院・創造，[4]株式会社シャンピニオン)

2F02-06　キナメツムタケ子実体由来の生体機能性物質の探索
○池尾 太良[1]，高橋 真奈美[2]，呉 静[3]，崔 宰熏[1,2,3,4]，平井 浩文[1,2,3,4]，河岸 洋和[1,2,3,4]　([1]静大・農，[2]静大院・総合農，[3]静大・グリーン研，[4]静大院・創造)

2F02-07　Identification and Characterization of a Novel Peptide Epimerase Responsible for the C-terminal D-Tryptophan Introduction in the Biosynthesis of Lasso Peptide, MS-271
○FENG Zhi[1]，OGASAWARA Yasushi[2]，DAIRI Tohru[2]　([1]Grad. Sch. Chem. Sci. Eng., Hokkaido Univ.，[2]Grad. Sch. Eng., Hokkaido Univ.)

2F02-08　ポリグルタミン酸生合成におけるエピメリ化酵素の同定
○加藤 陽菜多[1]，小笠原 泰志[2]，大利 徹[2]　([1]北大院総化，[2]北大院工)

2F02-09　Identification of tailoring enzymes in the biosynthesis of cyclochlorotine
○JIANG Yulu[1]，Ozaki Taro[1]，Liu Chengwei[1]，Igarashi Yuya[1]，Ye Ying[1]，Maruyama Jun-ichi[2]，Minami Atsushi[1]，Oikawa Hideaki[1]　([1]Fac. Sci., Hokkaido Univ.，[2]Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo)

2F02-10　糸状菌由来リボソームペプチド phomopsin A の翻訳後修飾反応の解析
○曽ケ端 花帆，五十嵐 祐也，尾﨑 太郎，劉 成偉，南 篤志，及川 英秋　(北大院理)

2F02-11　疫病菌交配ホルモンα2 の生合成中間体の同定
○今津 佑介[1]，有吉 俊[1]，大栗 隆二[2]，勝田 亮[3]，矢島 新[2]，小鹿 一[1]　([1]名大農，[2]東農大院・生命，[3]東農大・生命)

2F02-12　計算化学支援による cremenolide の構造改訂
○勝田 亮，矢島 新，石神 健，額田 恭郎　(東農大・生命)

2F02-13　Cremenolide の合成と構造改訂
○武田 圭太[1]，勝田 亮[2]，矢島 新[2]，石神 健[2]，額田 恭郎[2]，桑原 重文[1]　([1]東北大院農，[2]東農大院農)

2F02-14　Pochonin I の合成研究
○鈴木 悠生，勝田 亮，額田 恭郎，矢島 新，石神 健　(東農大・生命)

2F02-15　4,9- アンヒドロ -10- ヘミケタール -5- デオキシテトロドトキシンの合成研究
○宮坂 忠親[1]，安立 昌篤[2]，西川 俊夫[1]　([1]名大院生命農，[2]東北大院薬)

2F02-16　テトロドトキシンの推定生合成中間体 Tb-242C の合成研究
○西海 眞史[1]，西川 俊夫[1]，安立 昌篤[2]　([1]名大院生命農，[2]東北大院薬)

ミーティングルームF 質疑応答コアタイム 10:30～11:00

有機化学，天然物化学―合成，反応機構 / 天然物 - 単離構造決定 - 動物 , 植物 / 天然物 - 生合成―

2F04-01　ヒスチジン，ヒスタミンの水素重水素交換反応の検討
○橋本 誠，タクリム ゼトリアナ プテリ，杤木 真波 （北大農）

2F04-02　ペプチド合成における phenylglycine の構造化学的特性の検討
○石川 祥子，橋本 誠 （北大農）

2F04-03　光アフィニティーラベルを指向した(trifluoromethyldiazirinyl)phenylboronic acid 誘導体の新規合成法検討
○杤木 真波，橋本 誠 （北海道大農）

2F04-04　クランベシ B メチルエステルの合成研究
○丹台 剛太朗，中崎 敦夫，西川 俊夫 （名大院生命農）

2F04-05　アプリシアトキシン / オシラトキシン類縁体の合成
○波田 航平，西川 俊夫，中崎 敦夫 （名大院生命農）

2F04-06　茶テオガリン及びその類縁体の高純度試薬の開発
○森 拓哉，田村 敦裕，中塚 進一 （長良サイエンス株式会社）

2F04-07　甘草グリチルリチン及びその類縁体の高純度試薬の開発
田村 敦裕，森 拓哉，○藤野 和孝，中塚 進一 （長良サイエンス株式会社）

2F04-08　マテ葉部からの新規トリテルペンサポニンの単離および脂肪吸収抑制作用の評価
○徐 尹[1]，長友 暁史[1]，井上 尚樹[1]，今野 拓哉[1]，阪本 千夏[1]，曽根 万柚子[1]，柴坂 彩[1]，村岡 修[1,2]，二宮 清文[1,2]，吉川 雅之[1]，森川 敏生[1,2] （[1]近畿大薬総研，[2]近畿大アンチエイジングセ）

2F04-09　トウビシのポリフェノール成分とその抗糖化作用
○早川 智紗[1]，鈴木 勝一[1]，岩岡 裕二[1]，上村 知広[2]，伊東 秀之[1] （[1]岡山県立大保健福祉，[2]林兼産業株式会社）

2F04-10　アカエゾマツ精油香気の網羅的解明と未知成分の単離
○平間 智速，妙田 貴生，野島 聡 （東農大生物産業）

2F04-11　高知県産ミソハギ（*Lythrum anceps*）に含まれるリパーゼ阻害活性物質の単離と同定
○柳田 景亮[1]，柏木 丈拡[1]，鈴木 大進[2]，岡﨑 由佳[3]，金 哲史[1]，川北 浩久[2]，篠原 速都[3]，渡邊 浩幸[4]，水上 元[5] （[1]高知大農，[2]高知県海洋深層水研究所，[3]高知県工業技術センター，[4]高知県立大健栄，[5]高知県立牧野植物園）

2F04-12　結核菌由来 *E* 型イソプレニルニリン酸合成酵素の機能解析
○阿部 透，上田 大次郎，佐藤 努 （新潟大院自然）

2F04-13　クラス IB テルペン合成酵素の環状構造形成機構の解析
○浅田 和也[1]，上田 大次郎[1]，三木 邦夫[2]，藤橋 雅宏[2]，品田 哲郎[3]，佐藤 努[1] （[1]新潟大院自然，[2]京大院理，[3]阪市大院理）

2F04-14　酵素合成したアンブレインの龍涎香香気成分への変換と薬理活性解析
川越 幸奈[1]，上田 大次郎[1]，柿原 嘉人[2]，原 崇[1]，○佐藤 努[1] （[1]新潟大院自然，[2]新潟大歯）

2F04-15　酸無水物多量体 Cordyanhydride の生合成研究 (2)
○江口 桃香，長嶺 翔太，尾﨑 太郎，劉 成偉，南 篤志，及川 英秋 （北大院理）

2F04-16　コレステロール生合成阻害剤 phomoidride B の生合成研究 (2)
○山本 真太郎[1]，尾﨑 太郎[1]，劉 成偉[1]，丸山 潤一[2]，南 篤志[1]，及川 英秋[1] （[1]北大院理，[2]東大院農生科）

ミーティングルームF 質疑応答コアタイム 13:30～14:00

有機化学，天然物化学―天然物 - 単離構造決定 - 微生物 / 天然物 - 作用機構 / 農薬 , 医薬 / 合成，反応機構―

2F07-01　チャカイガラタケの生産する新規シクロフムラノイドの単離・構造決定
○橋本 勝[1]，猪瀬 航太[1]，西山 真未[1]，殿内 暁夫[1]，紺野 勝弘[2]，白濱 晴久[3] （[1]弘前大農生，[2]富山大学和漢研，[3]北海道大学）

2F07-02　"*Phaeoseptum* sp. が産生するスピロナフタレン誘導体"
○金原 龍飛，早坂 絢音，猪瀬 航太，三浦 聖美，岡村 毅，田中 和明，橋本 勝 （弘前大農生）

2F07-03　放線菌が生産する熱ショック代謝物のケミカルバイオロジー
○齋藤 駿[1]，加藤 航[1]，井本 正哉[2]，荒井 緑[1] （[1]慶應大理工，[2]順天堂大医）

2F07-04　マコモに感染する黒穂菌に関する化学的研究
○呉 静[1]，森本 悠介[2]，崔 宰熏[1,2,3]，平井 浩文[1,2,3]，河岸 洋和[1,2,3] （[1]静大・グリーン研，[2]静大院・総合農，[3]静大院・創造）

2F07-05　放線菌 *Streptomyces* sp. 519S から得られた lanthidin クラスに属する新規ペプチドの単離と構造決定
○荒川 美彩[1]，道羅 英夫[2]，小谷 真也[1] （[1]静大院農，[2]静大グリーン研）

2F07-06　「天狗の麦飯」から分離されたクテドノバクテリア（*Dictyobacter alpinus* Uno16）からの抗菌化合物の探索
○齋藤 彩菜[1]，白石 太郎[2]，葛山 智久[2,3]，新谷 尚弘[1]，工藤 雄大[1,4]，山下 まり[1]，阿部 敬悦[1]，横田 明[1]，矢部 修平[1] （[1]東北大院農，[2]東大院・農生化，[3]東大・微生物連携機構，[4]東北大学際研）

2F07-07　植物病原菌二次代謝産物フシコクシンの気孔開口による成長促進効果の検証
○桐山 寛生[1]，木下 悟[2]，木下 俊則[2]，春日 重光[1]，入枝 泰樹[1]，大神田 淳子[1] （[1]信州大農，[2]名大院理）

2F07-08　肝細胞糖産生を抑制するヒドロキシ脂肪酸 ricinoleic acid 類の構造活性相関研究
○吉田 潤[1]，上杉 祥太[2]，箱崎 真友佳[2]，藤澤 日土美[3]，伊藤 芳明[3]，木村 賢一[3] （[1]岩手医科大・教養教育，[2]岩手生工研，[3]岩手大・農）

2F07-09　カンゾウ由来成分 Glabridin とショウガ由来成分 Dehydrozingerone による相乗的な抗真菌効果およびそのメカニズム
○山野 沙耶[1]，荻田 亮[1,2]，山口 良弘[1]，藤田 憲一[1] （[1]阪市大院・理，[2]阪市大・健康研セ）

2F07-10　ICAM-1 の糖鎖修飾と細胞内輸送に対するウルサン型五環性トリテルペノイドの作用機序の解析
○中野 香織，佐々木 咲季，片岡 孝夫 （京都工芸繊維大学・応生）

2F07-11　Isopanduratin A は TNF レセプター 1 のエクトドメインシェディングを誘導することによって TNF-*α*誘導性の NF-*κ*B シグナル伝達経路を阻害する
○森脇 千紘[1]，谷垣 里穂[1]，三宅 靖延[2]，VO Trong Nghia[1]，NGUYEN Thi Thanh Mai[3]，NGUYEN Trung Nhan[3]，DO Van Nhat Truong[3]，NGUYEN Xuan Hai[3]，片岡 孝夫[1] （[1]京都工芸繊維大学・応生，[2]佐賀大学・医，[3]ベトナム国家大学ホーチミン市校）

2F07-12　プロシアニジン B2 の酸化機構の解明
○諏訪 雄大[1]，林 咲那[1]，片岡 永[2]，柳瀬 笑子[1,2] （[1]岐阜大院自然科技，[2]岐阜大応生）

2F07-13　Understanding the Regioselectivity in the Oxidative Condensation of Catechins Using Pyrogallol-type Model Compounds
○落合 悠斗[1]，廣瀬 紗弓[1]，柳瀬 笑子[1,2] （[1]岐阜大院自然科技，[2]岐阜大応生）

2F07-14　ジュラ紀の紅藻の化石から得られた赤色色素 borolithochrome 類の合成研究
○桐田 奏，細川 誠二郎 （早稲田大）

2F07-15　抗がん物質 poecillastrin C の C29-C38 部の合成研究
○田島 春佳，細川 誠二郎 （早大院先進理工）
2F07-16　ボネラタミド類の合成研究
○大岡 海斗[1]，中西 啓介[1]，宇田川 裕多郎[1]，市川 善康[2]，
細川 誠二郎[1] （[1]早大理工，[2]高知大理工）
2F07-17　シリビニンの高機能化を目指した創薬研究
○水野 美麗[1]，森 一憲[1]，土屋 圭輔[1,3]，髙木 孝士[2]，三澤 隆史[3]，
出水 庸介[3]，柴沼 質子[1]，福原 潔[1] （[1]昭和大薬，[2]昭和大医，[3]国衛研）

ミーティングルームG 質疑応答コアタイム 9:00～9:30

有機化学，天然物化学―天然物 - 単離構造決定 - 動物，植物 / 天然物 - 生合成 / 合成，反応機構―

2G01-01　根から分泌される細菌増殖刺激物質
○池ヶ谷 紘人，井田 和輝，小鹿 一，近藤 竜彦 （名大農）
2G01-02　ヒロヘリアオイラガ幼虫分泌液に含まれる TRPV1 活性化ペプチド Pll-3
○大西 真吾，松井 翼，岡咲 洋三，勝崎 裕隆 （三重大院生資）
2G01-03　ヤエヤマサソリの毒液に含まれる抗菌性ペプチドの探索と同定（第２報）
○三谷 直也，宮下 正弘，中川 好秋，宮川 恒 （京都大農）
2G01-04　キキョウ花弁に含まれる青紫色素の単離と構造決定
○萩原 星児，近藤 忠雄，吉田 久美 （名大情報）
2G01-05　イネの生産する推定 methoxy-5-deoxystrigol 異性体の同定
谷口 浩規[1]，謝 肖男[2]，北岡 直樹[3]，小林 峻大[4]，増口 潔[4]，
山口 信次郎[4]，○秋山 康紀[1] （[1]阪府大院・生命環境，[2]宇都宮大・バイオ，[3]北大院農，[4]京大化研）
2G01-06　溶解度分別法に基づくサイコサポニン単離法の検討
○高橋 正和，上田 奈穂，片野 肇 （福井県立大学）
2G01-07　抗腫瘍抗生物質マイトマイシンの生合成解析
○中川 陽[1]，小笠原 泰志[2]，大利 徹[2] （[1]北大院総化，[2]北大院工）
2G01-08　新規 ATP 依存ペプチドエピメラーゼ MurL の反応機構解析
○中尾 優文[1]，小笠原 泰志[2]，佐藤 康治[2]，大利 徹[2] （[1]北大院総化，[2]北大院工）
2G01-09　超好熱性アーキア由来ホスホメバロン酸デヒドラターゼの活性中心に存在する鉄硫黄クラスターの解析
○米山 睦[1]，三野 広幸[2]，保野 陽子[3]，品田 哲郎[3]，吉村 徹[1]，
邊見 久[1] （[1]名大院・生命農，[2]名大院・理，[3]大阪市大院・理）
2G01-10　アーキア型メバロン酸経路の鍵酵素ホスホ *-trans-* アンヒドロメバロン酸デカルボキシラーゼの酵素学的研究
○松嶋 夏海[1]，栗木 莉子[1]，保野 陽子[2]，品田 哲郎[2]，吉村 徹[1]，
邊見 久[1] （[1]名大院農，[2]大阪市大院理）
2G01-11　生合成環化酵素を用いた新規ドウモイ酸類縁体の生産
○前野 優香理[1]，小瀧 裕一[2]，寺田 竜太[3]，長 由扶子[1]，
此木 敬一[1]，山下 まり[1] （[1]東北大農，[2]福島学院大，[3]鹿児島大連合農）
2G01-12　フェナジノン類の網羅的合成法と活性・物性評価
○加茂 翔伍[1,2]，古波津 春希[1]，古田 将照[1]，細貝 拓也[3]，
友重 秀介[1]，大金 賢司[1]，倉持 幸司[1] （[1]東理大理工，[2]星薬大，[3]産総研・物質計測）
2G01-13　有機化学的アプローチによるニホンライチョウの保全研究
○倉持 幸司[1]，岡 咲幸[1]，國場 遼[1]，坪井 希[1]，保坂 啓介[1]，
土田 さやか[2]，小林 篤[3]，松林 誠[4]，牛田 一成[2] （[1]東理大・理工，[2]中部大・創発学術院，[3]環境省・信越自然環境事務所，[4]阪府大院・生命環境）
2G01-14　Pre-schisanartanin A の不斉全合成研究
○八木田 凌太郎，塚野 千尋，入江 一浩 （京大院農）
2G01-15　病原性凝集ペプチドの 3 量体モデルのリンカーとなるアルキル架橋トリス - α - アミノ酸の合成
○内野 歩美[1]，塚野 千尋[1]，今本 恒雄[2]，入江 一浩[1] （[1]京大院農，[2]千葉大院理）
2G01-16　抗 HIV 活性トリテルペノイド・ランシラクトン C の不斉全合成研究
○黒岩 秀崇，塚野 千尋，入江 一浩 （京大院農）

ミーティングルームG 質疑応答コアタイム 10:00～10:30

有機化学，天然物化学―天然物 - 単離構造決定 - 動物，植物 / 天然物 - 生合成 / 合成，反応機構―

2G03-01　ホウレンソウ葉における塩化銅ストレス誘導性化合物の同定
○鳥井 潤一郎，戸嶋 浩明，長谷川 守文 （茨城大農）
2G03-02　ツキヨタケ（*Omphalotus japonicus*）菌糸培養濾液より単離した新規な illudalane 型セスキテルペンについて
○青木 聡樹[1]，網干 貴子[1,2]，木村 賢一[1,3]，新井 大輔[4]，
飯塚 禎明[4]，村山 哲也[1,2] （[1]岩手大院連農，[2]山形大農，[3]岩手大農，[4]やまがたフィールド科学センター）
2G03-03　トマト由来の疫病菌無性生殖阻害物質の探索
○安藤 優花，加藤 史華，小鹿 一 （名大院・生命農）
2G03-04　緑藻スジアオノリ（*Ulva prolifera*）由来エタノール抽出物のメラニン形成抑制効果
○萩原 志保[1]，中澤 昌美[1]，上田 光宏[1]，鈴木 大進[2]，堀田 敏弘[2]，
川北 浩久[2]，橋爪 雄志[3]，タンジャ マハマド[3]，甲斐 建次[1]，
阪本 龍司[1] （[1]大阪府大院生命環境，[2]高知県海洋深層水研究所，[3]東洋精糖（株））
2G03-05　ナンキョウソウに含有される抗炎症作用成分
○坂本 裕介，二宮 清文，萬瀬 貴昭，村岡 修，森川 敏生 （近畿大・薬総研）
2G03-06　*Methanosarcina mazei* 由来プレニルニリン酸特異的 Nudix hydrolase の機能解明
○石橋 裕美，松嶋 夏海，吉村 徹，邊見 久 （名大農）
2G03-07　輸送工学を利用した大腸菌における効率的なアルカロイド生産
○山田 泰之[1]，潤井 みや[1]，大木 秀浩[1]，井上 開[1]，佐藤 文彦[2,4]，
南 博道[3]，士反 伸和[1] （[1]神戸薬大，[2]京大院生命，[3]石川県大，[4]阪府大院理）
2G03-08　デカリン合成酵素 Phm7 および Fsa2 の in vitro アッセイ系の構築
○加藤 直樹[1,2]，藤山 敬介[3]，野川 俊彦[2]，長田 裕之[2]，
永野 真吾[3]，高橋 俊二[2] （[1]摂南大農，[2]理研CSRS，[3]鳥取大院工）
2G03-09　生合成の *in vitro* 再構成系を利用した新規 trichostatin 類縁体の創生
○松田 悠太郎[1]，湯澤 賢[2]，青山 美和子[1]，大澤 宏祐[3]，
吉田 将人[3]，土井 隆行[3]，新家 一男[4]，西山 真[5,6]，葛山 智久[1,6]
（[1]東大院・農生科，[2]慶大・先端生命研，[3]東北大院・薬，[4]産総研，[5]東大・生物工学セ，[6]東大・微生物連携機構）
2G03-10　放線菌が生産するアゾキシアルケン化合物の生合成機構の解析
○田中 悠[1]，達川 綾香[2]，藤田 昂大[1]，岸本 拓也[2]，福本 敦[3]，
安齊 洋次郎[3]，荒川 賢治[1,2] （[1]広島大院・統合生命，[2]広島大院・先端研，[3]東邦大・薬）
2G03-11　3-*O*- ヘパラン硫酸モデル分子の合成研究
○西本 茉由，伊藤 優樹，村上 慧，山田 英俊，若森 晋之介 （関西学院大理工）
2G03-12　糖の柔軟化を基盤としたポリフェノールの合成研究
○松本 慎太郎，村上 慧，山田 英俊，若森 晋之介 （関西学院大理工）
2G03-13　ポリフェノールの一種である *C*- グリコシドエラジタンニンの合成研究
○楠木 怜奈[1]，藤本 和宏[2]，柳井 毅[2]，村上 慧[1]，山田 英俊[1]，
若森 晋之介[1] （[1]関西学院大理工，[2]名大ITbM）
2G03-14　*N*- ヒドロキシフタルイミド類縁体によるアルデヒドの酸化反応の調査
○髙松 啓吾，西澤 永愛，笠井 美郁，鈴木 莉緒，今野 博行 （山形大院理工）

2G03-15　高還元型ポリケチドである ishigamide の合成と立体化学の決定
○石神 健[1]，瀬尾 みつき[1]，ト タンヤオ[2]，勝山 陽平[2,3]，勝田 亮[1]，矢島 新[1]，額田 恭郎[1]，大西 康夫[2,3]（[1]東農大・生命，[2]東大院・農生科・応生工，[3]東大・微生物イノベ連携機構）

ミーティングルームG 質疑応答コアタイム 11:00～11:30

有機化学，天然物化学―天然物 - 単離構造決定 - 微生物 / 天然物 - 生合成 / 合成，反応機構―

2G05-01　アメリカ産テトロドトキシン含有イモリより得られた新規環状グアニジノ化合物
○工藤 雄大[1,2]，ハニフィン チャールス[3]，山下 まり[2]（[1]東北大学際研，[2]東北大院農，[3]ユタ州立大生物）

2G05-02　フグ由来の新規テトロドトキシン関連化合物
○八重樫 優士[1]，上山 望[1]，工藤 雄大[1,2]，長 由扶子[1]，此木 敬一[1]，山下 まり[1]（[1]東北大院農，[2]東北大学際研）

2G05-03　テトロドトキシン - タンパク質複合体作製のモデル反応と主生成物の構造決定
○善 瑞穂[1]，工藤 雄大[1,2]，長 由扶子[1]，此木 敬一[1]，山下 まり[1]（[1]東北大院農，[2]東北大学際研）

2G05-04　ホタテガイ（*Patinopecten yessoensis*）中における麻痺性貝毒代謝物の探索
○沼野 聡[1,2]，工藤 雄大[1,3]，長 由扶子[1]，此木 敬一[1]，山下 まり[1]（[1]東北大院農，[2]岩手県環境保健研究センター，[3]東北大学際研）

2G05-05　*Bacillus amyloliquefaciens* のランチペプチド生合成遺伝子の発現実験
○黒川 紗緒里，小谷 真也（静大院農）

2G05-06　Isolation and structural analysis of novel cholesterol-lowering metabolites in red yeast rice fermented by *Monascus pilosus*
○HIGA Yuki，Fukami Hiroyuki（R&D Center, Kobayashi Pharmaceutical Co., Ltd）

2G05-07　抗腫瘍活性の向上を指向した，計算化学に基づくランカサイジンの誘導体化
○西浦 茉摘[1]，MUSLIMIN Rukman[2]，ELREFAIY Mohamed[3]，森田 洋行[4]，AYOUB Ahmed[5]，荒川 賢治[1,2]（[1]広島大院・統合生命，[2]広島大院・先端研，[3]Zewail City of Science and Technology，[4]富山大院・和漢医薬学総合研究所，[5]Heliopolis Univ.）

2G05-08　Biosynthetic Studies on the Conversion of Pseudosugar in Acarbose
○TSUNODA Takeshi，Burade Sachin，Samadi Arash，Mahmud Taifo（Oregon State University）

2G05-09　goadvionin における脂肪酸部位の生合成の解析
○小境 陵介，浅水 俊平，尾仲 宏康（東大院・農生科）

2G05-10　type II AmCP を介して生合成される新規アミノ酸の同定及び生合成に関する研究
○曽根 祐輔[1]，Muhammad Prima PUTRA[1]，松田 研一[1]，古園 さおり[1,2]，西山 真[1,2]（[1]東大・生物工学セ，[2]東大・微生物連携機構）

2G05-11　スクアレン合成酵素に似た放線菌由来芳香族プレニル基転移酵素の構造学的研究
○永田 隆平[1,2]，末宗 周憲[3]，山本 将輝[3]，小林 正弥[1]，品田 哲郎[4]，西山 真[5,6]，永野 真吾[3]，葛山 智久[1,6]（[1]東大院・農生科，[2]日本学術振興会特別研究員PD，[3]鳥取大院工，[4]大阪市大・理，[5]東大・生物工学セ，[6]東大・CRIIM）

2G05-12　推定生合成経路を模倣した pestalotiopsin B から seiridiasteriscane 骨格への合成化学的変換
○石橋 理[1]，西山 真未[2]，權 垠相[3]，橋本 勝[2]，桑原 重文[1]，榎本 賢[1]（[1]東北大院農，[2]弘前大院農，[3]東北大院理）

2G05-13　南極産ホヤ由来メロテルペン rossinone A の全合成
○齋藤 克哉，倉沢 一輝，滝野 ちあき，桑原 重文，榎本 賢（東北大院農）

2G05-14　ポリフェノールアセタート類を基質とする，リパーゼ触媒反応の位置選択性
○須貝 威，橋本 理一，花屋 賢悟，東林 修平（慶應大薬）

2G05-15　L-Proline を触媒に用いたキナゾリノン類縁体の環境調和型合成法の開発
○槙山 浩平，徳本 健人，園田 素啓，谷森 紳治（阪府大院生命環境）

2G05-16　α - 不斉アリール化反応を利用した equol 誘導体の合成
○植村 隆人[1]，福井 菜月[2]，園田 素啓[1]，谷森 紳治[1]（[1]阪府大院生命環境，[2]阪府大生命環境）

ミーティングルームG 質疑応答コアタイム 13:00～13:30

植物―植物ホルモン，成長調節物質 / 植物栄養，光合成，オルガネラ，膜輸送 / 植物工学 - 育種，物質生産，形質転換―

2G06-01　ストリゴラクトンシグナルがイネに病害抵抗性を付与する機構の解明
○中村 英光[1]，伊藤 瑛子[1]，髙木 光佑[1]，山野 博之[1]，前田 哲[2]，神田 恭和[2]，草島 美幸[1]，藤田 萌香[3]，仲下 英雄[3]，森 昌樹[2]，浅見 忠男[1]（[1]東大院農生科，[2]農研機構生物研，[3]福井県立大生物資源）

2G06-02　共有結合型受容体阻害剤を用いたストリゴラクトン生理作用発現機構の解析
○大沼 彩香，喜久里 貢，胡 文倩，平山 遼太，中村 英光，浅見 忠男（東大農）

2G06-03　ストリゴラクトン生産を阻害する新規化合物の創製
○川田 紘次郎[1]，高橋 郁夫[2]，小野田 聡志[1]，野村 崇人[3]，佐々木 康幸[1]，浅見 忠男[2]，矢嶋 俊介[1]，伊藤 晋作[1]（[1]東京農大・バイオ，[2]東大院・農生科，[3]宇都宮大・バイオ）

2G06-04　コケ植物におけるストリゴラクトン生合成
○依田 彬義[1,2]，謝 肖男[2]，島崎 翔太[3]，児玉 恭一[3]，米山 香織[4]，秋山 康紀[5]，嶋村 正樹[6]，経塚 淳子[3]，野村 崇人[2]（[1]東京農工大院・連合農，[2]宇都宮大・バイオ，[3]東北大院・生命科学，[4]愛媛大院・農，[5]大阪府大院・生命環境，[6]広島大院・統合生命）

2G06-05　根寄生植物ヤセウツボの発芽に及ぼすトリプトファン関連分子の作用について
○来馬 道生，鈴木 泰輝，瀬戸 義哉（明治大農）

2G06-06　ゴール形成ハバチにおけるインドール酢酸生合成に関わる芳香族アルデヒド合成酵素の解析
○宮田 海，武井 麻美，鈴木 義人（茨大・農）

2G06-07　藍藻の新規強光応答機構を担う Na^+/H^+ アンチポーターの同定と機能解析
○小林 歩夢[1]，辻井 雅[1]，狩野 文香[1]，解良 康太[1]，児島 征司[2]，小口 理一[3]，彦坂 幸毅[2]，園池 公毅[4]，魚住 信之[1]（[1]東北大院・工，[2]東北大院・生命，[3]東大院・理，[4]早稲田大学・教育科学学術院）

2G06-08　シロイヌナズナにおける気孔孔辺細胞の葉緑体数の解析
○村松 亮輔[1]，山田 真誼[1]，サンジャヤ アルビン[1]，安澤 愛[1]，吉野 彩花[1]，伊藤 竜一[2]，藤原 誠[1]（[1]上智大理工，[2]琉球大理）

2G06-09　アミノ酸代謝酵素の遺伝的な欠損によるイネの種子成分の変化
○小島 創一（東北大農）

2G06-10　カプサイシン生合成における推定アミノトランスフェラーゼ，カプサイシンシンターゼの関与
○中里 彩夏[1]，金島 一樹[1]，三澤 悠貴[1]，佐野 香織[1]，中谷 祥恵[1]，田中 義行[2]，古旗 賢二[1]（[1]城西大，[2]京都大）

2G06-11　カプサイシン生合成における推定アミノトランスフェラーゼの関与
○三澤 悠貴，中里 彩夏，佐野 香織，中谷 祥恵，古旗 賢二（城西大学）

2G06-12　生薬植物カラスビシャクのアラバン生合成酵素遺伝子の探索
○青木 達大[1]，下川 響[1]，江口 壽彦[2]，松岡 健[1,2,3]（[1]九大院生資環，[2]九大生環セ，[3]九大院農）

2G06-13　Production of recombinant β-glucocerebrosidase enzyme in glycoengineered *Nicotiana benthamiana* root culture
○UTHAILAK Naphatsamon[1,2]，KAJIURA Hiroyuki[1,2]，MISAKI Ryo[1,2]，FUJIYAMA Kazuhito[1,2]　([1]Osaka Univ.，[2]ICBiotech.)

ミーティングルームH 質疑応答コアタイム 9:30～10:00

植物―遺伝子 - 構造解析，ゲノム，遺伝，変異 / 遺伝子 - 機能，発現制御 / 環境応答，ストレス応答，情報伝達，分化 / その他―

2H02-01　尾上菜が示す自家不和合性の機構解析
○池田 直樹[1]，中島 遼太[1]，尾西 晃一[2]，小倉 淳[1,2]，蔡 晃植[1,2,3]
([1]長浜バイオ大院・バイオ，[2]長浜バイオ大・バイオ，[3]長浜バイオ大・ゲノム編集研究所)

2H02-02　ゲノム編集技術の食品利用におけるオフターゲット予測と解析スキームの確立
○成島 純平[1]，中村 公亮[1]，木俣 真弥[1]，志波 優[2]，秋本 智[1]，曽我 慶介[1]，吉場 聡子[1]，権藤 崇裕[3]，明石 良[3]，柴田 識人[1]，近藤 一成[1]　([1]国立衛研，[2]東京農大，[3]宮崎大)

2H02-03　The design of the inserted oligo ends for the precision genome editing by the microhomology-mediated end joining (MMEJ) repair of the genome of tomato protoplast
○MURAOKA Jin[1]，SLAMAN Ellen[2]，LAMMERS Michiel[2]，A. DE MAAGD Ruud[2]，C. ANGENENT Gerco[2]　([1]Panasonic Corp.，[2]Wageningen University & Research)

2H02-04　イネにおけるカルス形成制御遺伝子の探索と解析
○西尾 陸[1]，春名 沙紀[1]，沼本 穂[1]，森田 重人[1,2]，増村 威宏[1,2]
([1]京都府立大学・生命環境，[2]京都府農技セ・生資セ)

2H02-05　マルチオミクス解析によるシロイヌナズナ種内雑種におけるバイオマス増加メカニズムの解析
○杉 直也[1]，レ ティ ノ クイン[1]，小林 誠[2]，草野 都[1,2]，柴 博史[1]
([1]筑波大院・生命環境，[2]理研・CSRS)

2H02-06　イネのファイトアレキシン生合成遺伝子発現における上流保存領域の機能
○茂木 郁也[1]，冨山 詩歩[1]，吉田 悠里[1]，宮本 皓司[2]，野尻 秀昭[1]，岡田 憲典[1]　([1]東京大学生物生産工学研究センター(東大生セ)，[2]帝京大学理工学部バイオサイエンス学科)

2H02-07　植物におけるフラビン代謝制御に関与する新規転写因子の機能解析
○原田 美帆[1]，難波 純也[1]，丸田 隆典[1]，石川 孝博[1]，吉村 和也[2]，重岡 成[3]，小川 貴央[1]　([1]島根大院・自然科学，[2]中部大・応生・食栄，[3]近畿大・附属農場)

2H02-08　植物のアスコルビン酸生合成律速酵素 VTC2 の発現制御因子の同定
熊谷 憲明[1]，宇佐見 幸太[1]，長谷川 未希[1]，渡辺 雄太[1]，石川 孝博[2]，○吉村 和也[1]　([1]中部大応生，[2]島根大生資科)

2H02-09　イネの分げつ形成を制御する遺伝的機構
○田中 若奈[1]，平野 博之[2]　([1]広島大院統合生命，[2]東大院理)

2H02-10　転写制御ネットワーク網羅的解析技術を用いたイネ側根メリステムサイズの調節機構の解析
○安福 航希，兒島 孝明，犬飼 義明，岡 大椰，中野 秀雄　(名大院・生命農学)

2H02-11　ラズベリー培養細胞を用いたフラボノイド変換反応
○小堀 亮，齊藤 安貴子　(大阪電気通信大学大学院工学研究科先端理工学専攻)

2H02-12　大麦穀粒の機能性成分含量に及ぼす変異遺伝子の影響
○野方 洋一[1]，阿部 大吾[1]，長嶺 敬[2]，杉田 知彦[1]，吉岡 藤治[1]
([1]農研機構 西日本農研，[2]農研機構 中央農研)

2H02-13　ボイセンベリー葉の有効利用について
○橋本 奈々美[1]，水木 徹[4]，三浦 健[1,2,3]　([1]東洋大院・生命科学，[2]東洋大学・生命科学，[3]東洋大学・ ライフイノベーション研究所，[4]東洋大学・バイオナノエレクトロニクス研究センター)

2H02-14　切り花の鮮度保持におけるナノバブルの作用機構
○中澤 利恵[1]，田中 玲桐[2]，畑 直樹[1]，南川 久人[3]，原田 英美子[1]
([1]滋賀県大・環境科学，[2]滋賀県大院・工，[3]滋賀県大・工)

ミーティングルームH 質疑応答コアタイム 10:30～11:00

動物―細胞 - 情報伝達，細胞応答，分化制御 / 個体 - 生理・栄養・代謝，生体機能，生体制御，メタボローム / 細胞工学 - 物質生産，タンパク質工学，細胞培養，細胞外マトリックス―

2H04-01　IgA 誘導における Class A CpG オリゴ DNA のアジュバント効果
○山本 祥也，大舘 佳歩，鈴木 卓弥　(広島大生生)

2H04-02　霊長類 T1R1 および T1R2 抗体の作製
○小松 さゆり[1,2]，中安 亜希[1]，大島 永心[1]，新藤 壮剛[1]，今井 啓雄[3]，伯川 美穂[2]，杉山 宗太郎[3]，綾部 時芳[2]，中村 公則[2]，山根 拓実[1]，大石 祐一[1]，岩槻 健[1]　([1]東京農大，[2]北大，[3]京大)

2H04-03　抗線維化薬ピルフェニドンの薬理作用点同定に向けた探索研究
○竹内 大修，辰川 英樹，横島 聡，人見 清隆　(名大院創薬科学)

2H04-04　Hydrogen sulfide suppresses the proliferation of intestinal epithelial cells through cell-cycle arrest
○XU WENXI，Yamamoto Yoshinari，Suzuki Takuya
(Hiroshima Univ.)

2H04-05　培養ヒト表皮細胞の分化に空気暴露が必須とされるメカニズムの解析
○伊藤 帆南，手島 裕文，辰川 英樹，人見 清隆　(名大院創薬科学)

2H04-06　マウスの胎生段階における表皮形成と羊水中の促進因子の解析
○川口 友輔，栗林 美樹，手島 裕文，辰川 英樹，人見 清隆　(名大院創薬科学)

2H04-07　神経細胞 HT22 における温熱依存的な PGRN の発現制御
○沈 玉菠，藤井 拓都，下田 歩夢，下川 裕理夏，佐藤 飛翔，根建 拓　(東洋大学)

2H04-08　マウス細胞の寒冷刺激耐性機構とベージュ脂肪細胞への分化
○塩見 尚史，冨士原 由貴　(神戸女学院人間科学)

2H04-09　マウス真皮線維芽細胞における温熱依存的なコラーゲン産生調節
○中島 翼空，森 彩乃，吉川 綾乃，佐藤 (石内) 友里，根建 拓　(東洋大)

2H04-10　短期温熱処理による骨格筋マイオカインの動態変化
○村田 圭吾，大川 俊也，渡邉 拓実，佐藤 (石内) 友里，根建 拓　(東洋大)

2H04-11　摂食時間制限が体重増加，脂質代謝，摂食パターンに及ぼす影響
○小西 菜々星[1]，三浦 徳[2]，奥江 紗知子[3]，増澤(尾﨑) 依[1]，細野 崇[1,3]，関 泰一郎[1,2,3]　([1]日大・生資科・生命化，[2]日大・生資科・総合研究所，[3]日大院・生資科・応生科)

2H04-12　果糖ブドウ糖液糖飲料の過飲による非肥満２型糖尿病の誘発
○服部 秀美，花井 悠真，大島 佑人，江藤 望　(宮崎大農)

2H04-13　加齢が社会的ストレス負荷時の生体応答機構に与える影響
○田中 航[1]，下位 香代子[2]，榊原 啓之[1]　([1]宮崎大農，[2]静岡県大食)

2H04-14　機械学習を利用したマウス聴性脳幹反応における閾値の自動解析
○大池 秀明[1,2]，小谷野 仁[1]　([1]農研機構・農情研，[2]農研機構・食品研)

2H04-15　ヒト iPS 細胞からの小腸オルガノイドおよび単層上皮細胞の樹立
○高橋 裕，山内 祥生，佐藤 隆一郎　(東大院・農生科・応生化)

2H04-16　安価で安定的なヒト小腸オルガノイド培養技術の開発
○久世 圭太朗，高橋 裕，山内 祥生，佐藤 隆一郎　(東大院・農生科・応生化)

2H04-17　株化イヌ由来マスト細胞の大気圧 CO_2 レベルでの培養と脱顆粒活性に関する研究
○西川 洋史 （ドルトン東京学園中等部・高等部）

ミーティングルームH 質疑応答コアタイム 13:30～14:00

動物―個体 - 生理・栄養・代謝，生体機能，生体制御，メタボローム / タンパク質 - 構造，機能，活性，修飾，分解，局在，プロテオーム―

2H07-01　扁桃体と前障から前頭前野への投射回路による社会行動と社会記憶制御機構
○谷水 俊之[1,2]，櫻内 華恵[2]，石川 理絵[1,2]，喜田 聡[1,2] （[1]東大院・農・応用生命化学，[2]東農大院・農・バイオ）

2H07-02　必須アミノ酸ヒスチジンによる記憶増強効果
○川嶋 珠生[1]，樺山 音々[2]，小田切 友紀[2]，谷水 俊之[1,2]，石川 理絵[1,2]，喜田 聡[1,2] （[1]東京大農，[2]東農大農）

2H07-03　恐怖記憶制御プロセスに対する青斑核の役割の解析
○在原 悠[1,2]，喜田 聡[1,2] （[1]東農大院・農・バイオ，[2]東大院・農・応用生命科学）

2H07-04　海馬の社会忌避記憶エングラムの光遺伝学的抑制は PTSD 様行動を改善する
○武生 優花[1,2]，石川 理絵[1,2]，喜田 聡[1,2] （[1]東大院・農生科・応生化，[2]東農大院・農・バイオ）

2H07-05　ニコチン依存性場所嗜好記憶課題を用いた薬物依存性記憶エングラムの同定
○海野 匡紀[1,2]，喜田 聡[2]，石川 理絵[2] （[1]東農大農，[2]東大農）

2H07-06　アデノシン A2a 受容体が海馬依存性記憶想起を制御する
○渡邊 亮介[1,2]，長谷川 俊介[1]，喜田 聡[1,2] （[1]東農大院・農・バイオ，[2]東大院・農・応用生命化学）

2H07-07　Aβ42 海馬注入アルツハイマー型認知症モデルマウスにおける時間帯依存的記憶障害
○ボーグ ジェームス，喜田 聡 （東大院・農・応用生命化学）

2H07-08　MIG12 は LXR 活性化による ACC ポリマー化亢進に関与する
和泉 彬子[1]，平口 遥香[1]，小高 愛未[2]，池内 江美奈[1]，成田 淳子[1]，小林 里奈[3]，松本 雄宇[2]，鈴木 司[2]，山本 祐司[2,3]，佐藤 隆一郎[1]，○井上 順[2,3] （[1]東大院・農生科・応生化，[2]東農大・応生科・農化，[3]東農大院・応生科・農化）

2H07-09　腸管粘膜での IgA 分泌における転写抑制因子 Bach1 の機能解析
○濵田 理久[1]，谷川 潤[1]，武藤 哲彦[2]，五十嵐 和彦[2]，髙木 智久[3]，内藤 裕二[3]，東村 泰希[1,3] （[1]石川県大・生資環，[2]東北大院・医，[3]京府医院・医）

2H07-10　転写抑制因子 Bach1 の欠損は大腸上皮において細胞増殖を促進する。
○谷川 潤[1]，水島 かつら[2]，平井 泰子[2]，武藤 哲彦[3]，五十嵐 和彦[3]，髙木 智久[2]，内藤 裕二[2]，東村 泰希[1,2] （[1]石川県大・生資環，[2]京府医院・医，[3]東北大院・医）

2H07-11　転写抑制因子 Bach1 の欠損に伴う大腸ムチンの性状変化について
○米澤 明莉[1]，谷川 潤[1]，水島 かつら[3]，平井 泰子[3]，武藤 哲彦[2]，五十嵐 和彦[2]，髙木 智久[3]，内藤 裕二[3]，東村 泰希[1,3] （[1]石川県大・生資環，[2]東北大院・医，[3]京府医院・医）

2H07-12　筋萎縮モデル・骨格筋特異的 FOXO1 過剰発現マウスの血液メタボローム解析；カルノシン量の変化
○水谷 彩子，中井 志帆，大藪 葵，亀井 康富 （京都府立大生命環境）

2H07-13　哺乳類細胞を用いた接着斑タンパク質ビネキシンαの精製系構築
○鎌田 一希，木村 泰久，木岡 紀幸 （京大院農）

2H07-14　*ZNT5ZNT7* 二重欠損株における亜鉛要求性酵素の運命は膜結合様式によって大きく左右される
○下間 敬子，神戸 大朋 （京都大生命）

2H07-15　ミスフォールドタンパク質およびジスルフィド結合依存的な IRE1 の会合状態制御
○松崎 元紀[1,2]，稲葉 謙次[2]，奥村 正樹[1] （[1]東北大学学際研，[2]東北大多元研）

2H07-16　サリドマイド催奇性を担う $CRL4^{CRBN}$ のネオ基質の同定
○朝妻 知子[1]，伊藤 拓水[1]，山口 雄輝[2]，半田 宏[1] （[1]東医大医，[2]東工大生命）

2H07-17　熱帯熱マラリア原虫が産生する Histidine-rich protein 2 の病原性メカニズムの解明
○岩崎 崇[1,2]，金山 葉瑠[1]，下田 麻由[2]，河野 強[1,2] （[1]鳥取大・農，[2]鳥取大院・持続）

講演番号　　演　題　　発表者氏名(所属)

ミーティングルームA 質疑応答コアタイム 9:00～9:30

微生物ー細胞 - 栄養，生育，増殖 / 細胞 - 情報伝達，細胞応答，ストレス応答 / 物質生産 - 醸造，発酵（一次代謝産物）ー

3A01-01　硫黄代謝を司る転写制御因子 CysB がプラスミド非感受性の鍵因子である
○河野 響[1]，水口 千穂[1,2]，岡田 憲典[1]，野尻 秀昭[1,2]（[1]東大・生物工学セ，[2]東大・微生物連携機構）

3A01-02　新規抗真菌薬感受性検査の開発
○中田 惇彦，田邊 公一（龍谷大農）

3A01-03　特定波長下における微細藻類の小スケール培養での照射光の影響に関する研究
○阿部 里奈，伊藤 賢一，大内 秋比古，青山 忠（日本大学）

3A01-04　沖縄で分離した藍還元菌の生育特性
○世嘉良 宏斗，松田 和希，松本 亜里奈，荻 貴之（沖縄県工業技術センター）

3A01-05　オボムチン由来 *O*- 結合型糖鎖の腸内細菌による分解
○高田 紘翠，加藤 紀彦，片山 高嶺（京都大学）

3A01-06　*Aspergillus nidulans* における一酸化窒素ストレス誘導型グリセロアルデヒド 3- リン酸デヒドロゲナーゼ GpdC の機能解析
○門岡 千尋，鈴木 康太，桝尾 俊介，高谷 直樹（筑波大生命環境）

3A01-07　植物由来精油成分ファルネソールに対する糸状菌 *Aspergillus fumigatus* の応答機構
○老木 紗予子[1]，二宮 章洋[1]，浦山 俊一[1,2]，萩原 大祐[1,2]（[1]筑波大・生命環境，[2]筑波大・MiCS）

3A01-08　Novel function of transglutaminases in wound protection at the site of cell-to-cell communication in fungal multicellularity
○MAMUN Md. Abdulla Al[1]，HITOMI Kiyotaka[2]，MARUYAMA Jun-ichi[1,3]（[1]Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo，[2]Grad. Sch. Pharm. Sci., Nagoya Univ，[3]CRIIM, UTokyo）

3A01-09　アカパンカビの *col-26* 株と *sor-4* 株のソルボース耐性とグルコース抑制に関する研究
○平井 献士[1]，井手本 拓也[2]，加藤 志穂[2]，一石 昭彦[1,2]，藤村 真[1,2]（[1]東洋大院・生命，[2]東洋大・生命）

3A01-10　GWAS を用いた *Zygosaccharomyces rouxii* の凍結耐性メカニズムの解明
○森本 一輝，菊池 成真，邱 泰瑛，小西 正朗（北見工業大学）

3A01-11　コリネ型細菌の脂肪酸代謝に見出した基質回路(Futile cycle)の検証と意義
○大竹 辰徳，高橋 敬祐，井元 瞭介，竹野 誠記，池田 正人（信州大農）

3A01-12　コリネ型細菌によるパルミトレイン酸の生産(第三報)
○北村 嘉子，竹野 誠記，池田 正人（信州大農）

3A01-13　コリネ型細菌によるデチオビオチンの生産
○原 志門，竹野 誠記，池田 正人（信州大農）

3A01-14　デオキシリボヌクレオチド生合成経路遺伝子を破壊した大腸菌の生育評価
○出口 賢児[1]，斯 大勇[1]，堀之内 伸行[1]，小園 祥子[1]，竹内 道樹[1]，日比 慎[1,2]，Anthony M. poole[3]，小川 順[1]（[1]京大院農，[2]富山県立大工，[3]オークランド大学）

3A01-15　放線菌において培養温度が一次代謝産物の生産に与える影響
○内倉 寛斗[1]，山本 省吾[2]，山田 佑樹[2]，曽田 匡洋[2]，柘植 陽太[1,3]（[1]金沢大院・自科，[2]長瀬産業株式会社，[3]金沢大・新学術）

ミーティングルームA 質疑応答コアタイム 10:00～10:30

微生物ー物質生産 - 発酵（二次代謝産物，抗生物質，ペプチド，生理活性物質）/ 細胞 - 複合微生物，共生微生物，難培養性微生物 / 遺伝子 - 発現制御，トランスクリプトームー

3A03-01　*Lactobacillus plantarum* PUK6 の多成分バクテリオシン生合成関連遺伝子群の分子解析
○河原 あい[1]，志賀 梨沙[2]，善藤 威史[3]，松崎 弘美[1,2]（[1]熊本県大院環境共生，[2]熊本県大環境共生，[3]九大院農）

3A03-02　乳酸菌が生産する新奇バクテリオシンおよび抗菌タンパク質の探索と構造・特性の解析
野見山 泰成，山城 圭輔，桑原 美空，中山 二郎，園元 謙二，○善藤 威史（九大院・農）

3A03-03　発酵食品由来乳酸菌におけるフェルラ酸エステラーゼ活性
○矢野 嵩典，野田 健太，徳永 陽花，三井 亮司（岡山理大理）

3A03-04　*Aeromonas hydrophila* における低電位電極からの電子を利用した還元的代謝
○土屋 美愉，高妻 篤史，渡辺 一哉（東薬大生命）

3A03-05　*Bacillus cereus* YB-4 由来ポリエステル重合酵素と分子シャペロンを共発現させた組換え大腸菌による 3- ヒドロキシブタン酸オリゴマーの分泌生産
○後藤 早希[1,2]，宮原 佑宜[2,3]，山田 麻里子[1,2]，柘植 丈治[2,3]，廣江 綾香[1,2]（[1]東農大，[2]JST-MIRAI，[3]東工大院）

3A03-07　ヨウ素含有廃水を処理する活性汚泥のユニークな微生物群集とヨウ素をめぐる種間相互作用
○松下 真由美[1,2]，青柳 智[1]，稲葉 稲葉[1]，堀 知行[1]，羽部 浩[1]，佐藤 由也[1]（[1]産総研・環境創生，[2]学振RPD）

3A03-08　嫌気性腸内細菌と腸上皮細胞の共培養を可能とするフロー型アピカル嫌気培養器の開発
○後藤 愛那[1]，橋本 豊之[2]，米田 恭子[2]，藤山 陽一[2]，小関 英一[2]，加藤 紀彦[1]，田川 陽一[3]，金 倫基[4]，長谷 耕二[4]，片山 高嶺[1]（[1]京大生命，[2]島津製作所基盤，[3]東工大生命理工，[4]慶応薬）

3A03-09　増殖の開始を制御する微生物間相互作用ー環境中の微生物コミュニティが織りなす増殖制御ネットワーク
○鈴木 陸太，ソ ウニョン，加藤 節，中島田 豊，青井 議輝（広島大学）

3A03-10　カーボンマイナス農業を可能にする植物炭土壌の創出
○西田 亮也[1,2]，高野 雅夫[1]，宮本 憲二[3]，加藤 康夫[4]，安藤 晃規[5,6]，小川 順[5,6]，篠原 信[2]（[1]名大院環，[2]農研機構，[3]慶大理工，[4]富山県大・生医工研セ，[5]京大院農，[6]京大・生理化学研究ユニット）

3A03-11　アミノ酸および誘導体による根の成長にあたえる影響の解析
○黄 穎[1]，篠原 信[2]，加藤 康夫[3]，安藤 晃規[4,5]，小川 順[4,5]，宮本 憲二[1]（[1]慶大・理工，[2]農研機構，[3]山県大・生医工研セ，[4]京大院農・応用生命，[5]京大・生理化学）

3A03-12　酵母 D- アスパラギン酸オキシダーゼ機能発現におけるピルビン酸カルボキシラーゼの機能解析
○今西 大生，財津 奏太，高橋 祥司（長岡技大院工）

3A03-13　黒麹菌 *Aspergillus luchuensis* のニゲラン合成酵素遺伝子群の同定と機能解析
○上地 敬子，渡嘉敷 直杏，平良 東紀，水谷 治（琉球大農）

3A03-14　麹菌におけるカーボンカタボライト抑制を制御する脱ユビキチン化酵素 CreB によるアレスチン様タンパク質 CreD の発現制御
○田中 瑞己[1]，藤田 翔貴[2]，河原崎 泰昌[1]，新谷 尚弘[2]，五味 勝也[2]（[1]静県大食栄，[2]東北大農）

3A03-15　麹菌の転写因子破壊株ライブラリーを利用した細胞壁構成成分の生合成制御因子の探索
○福永 貴弘，藤田 翔貴，五味 勝也（東北大農）

3A03-16　糸状菌 *Aspergillus nidulans* におけるカーボンカタボライト抑制に関わる新奇転写因子
○國武 絵美[1]，柴山 智洋[2]，土谷 結衣[3]，花井 優大[4]，中村 真也[2]，木村 哲哉[1]，木村 真[2]，小林 哲夫[2]（[1]三重大院生資，[2]名大院生命農，[3]名大農，[4]三重大生資）

3A03-17　C1 酵母 *Candida boidinii* におけるメタノール誘導性 mRNA の細胞内動態可視化解析
○赤木 美穂，幅田 亜香莉，由里本 博也，阪井 康能（京大院農）

ミーティングルームA 質疑応答コアタイム 11:00～11:30

微生物―物質生産 - 微生物変換，微生物酵素反応 / 遺伝子 - 構造，機能 / 細胞 - 栄養，生育，増殖―

3A05-01　エチレングリコールからのグリコール酸合成量向上を目指した高活性変異酵素スクリーニング系の構築
○村主 渉[1]，山下 岳士[1]，山田 美和[2]（[1]岩手大院，[2]岩手大農）

3A05-02　生分解性プラスチックナイロン 4 分解酵素の精製と諸性質解明
○佐々浪 由梨香[1]，外村 彩香[2]，河合 盛進[3]，鈴木 宏昭[3]，山田 美和[1,4]（[1]岩手大・院総合科学，[2]熊本県大・共生環境，[3]トヨタ紡織・新領域開拓部，[4]岩手大・農）

3A05-03　位置選択性の異なる二種類のエクオール水酸化酵素の機能解析
○野澤 大樹[1]，向井 克之[2]，松山 彰収[2]，古屋 俊樹[1]（[1]東京理科大院・理工，[2](株)ダイセル）

3A05-04　組換え微生物による高性能バイオポリエステルの生合成
○岡本 沙樹[1]，久永 理央[2]，西 愛美[2]，西上 明花[2]，後藤 早希[2]，河原 あい[1]，田中 賢二[3]，田口 精一[4]，松崎 弘美[1,2]（[1]熊本県大院・環境共生，[2]熊本県大・環境共生，[3]近畿大・産理工，[4]東農大・生命科学）

3A05-05　糸状菌 *Trichoderma asperellum* 由来糖質加水分解酵素の研究
○豊田 稜介[1]，劉 麗[1]，坂川 絵里香[1]，中村 華穂[2]，桑原 優樹[2]，鈴木 孝征[1,3]，金政 真[1,2]（[1]中部大院・応生，[2]中部大・環生科，[3]中部大・応生化）

3A05-06　Csr システムにおける小分子 RNA 安定性制御因子 CsrD の解析
○吉田 将来[1]，山田 竣太[1]，石黒 志実[1]，岡村 龍盛[2]，杉本 華幸[1,2]，鈴木 一史[1,2]（[1]新潟大院・自然科学，[2]新潟大・農）

3A05-07　*Saccharomyces cerevisiae* と *Saccharomyces eubayanus* からなる disomy の解析
○山下 敦士[1,2]，高橋 朋子[1,2,3]，加藤 拓[3]，只見 秀代[3]，永富 康司[3]，岩間 亮[1,2]，福田 良一[1,2]，堀内 裕之[1,2]，野田 陽一[1,2]（[1]東大院・農生科，[2]東大・微生物連携機構，[3]アサヒクオリティーアンドイノベーションズ(株)醸造科学研究所）

3A05-08　サナギタケ（*Cordyceps militaris*）由来レクチン遺伝子群の遺伝子クローニングおよび異種発現系の構築
○佐藤 千裕[1]，依田 彬義[1,2]，小野 晶子[1,2]，鈴木 稔之[1]，田中 裕紀[2,3]，金野 尚武[2,3]，野村 崇人[1,2]，鈴木 智大[1,2]（[1]宇都宮大・バイオ，[2]宇都宮大・農，[3]東京農工大・連合農学）

3A05-09　冬虫夏草サナギタケ（*Cordysceps millitaris*）の交配型遺伝子の機能解析
○鈴木 稔之[1]，小野 晶子[1]，鈴木 貴也[2]，崔 宰熏[3,4]，河岸 洋和[3,4]，道羅 英夫[2,4]，鈴木 智大[1]（[1]宇都宮大・バイオ，[2]静岡大・理，[3]静岡大・農，[4]静岡大・グリーン研）

3A05-10　DNA 損傷依存的な姉妹染色分体間接着への核膜孔の関与
○堀籠 智洋[1]，折原 行希[1]，高橋 大輔[1]，小西 辰紀[1]，尾間 由佳子[1]，島田 健士[2]，ガッサー スーザン[2]，原田 昌彦[1]（[1]東北大農，[2]フリードリッヒ・ミーシャー生物医学研究所）

3A05-11　ビフィズス菌によるスクロースアナログ二糖の資化に関する研究
○保坂 浩貴，中村 啓喜，平野 貴子，袴田 航，西尾 俊幸（日大院生資科）

3A05-12　スクロースアナログ二糖によるヒト腸内由来細菌の増殖特性
○中村 啓喜[1]，保坂 浩貴[1]，栗栖 由佳[2]，平野 貴子[1,2]，袴田 航[1,2]，西尾 俊幸[1,2]（[1]日大院生資科，[2]日大生資科）

3A05-13　D- システインの抗菌力評価と抗菌力要因の検討
○内田 脩斗[1]，松村 吉信[1,2]（[1]関西大・生命生物工，[2]関西大・ORDIST）

3A05-14　ブタの糞から単離された *Parabacteroides distasonis* のコハク酸産生条件
○佐藤 茉由[1]，宮本 浩邦[1,2,3]，児玉 浩明[1]（[1]千葉大院・園芸，[2]サーマス，[3]理研・IMS）

3A05-15　緑膿菌バイオフィルム形成を抑制または促進する物質の探索
○俣木 歩実[1]，松村 吉信[2]（[1]関西大・生命生物工，[2]関西大・ORDIST）

ミーティングルームA 質疑応答コアタイム 13:00～13:30

微生物―代謝 - 代謝調節，発酵生理，メタボローム / 遺伝子 - 構造，機能 / 細胞 - 分離，分類，生態―

3A06-01　高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB27 における短鎖アシル CoA 合成酵素ホモログの構造機能解析
○高島 慶一郎[1]，吉田 彩子[1,2]，富田 武郎[1,2]，葛山 智久[2,3]，古園 さおり[1,2]，西山 真[1,2]（[1]東大・生物工学セ，[2]東大・微生物連携機構，[3]東大院・農生科）

3A06-02　*Hydrogenophilus thermoluteolus* TH-1 株の PHB 生合成誘導時における細胞内の状態変化
○山本 将大[1]，亀谷 将史[1,2]，新井 博之[1,2]，石井 正治[1,2]（[1]東大院農生科 応生工，[2]東大微生物連携機構）

3A06-03　放線菌によるルミクロム分解機構の解明
○鈴木 麻菜美[1]，尾崎 紗代子[1]，土肥 裕希[1,2]，高谷 直樹[1,2]（[1]筑波大院生命環境，[2]微生物サステナビリティ研究センター）

3A06-04　ルマジン資化性菌の単離とその分解機構
○前田 典歩[1]，土肥 裕希[1,2]，高谷 直樹[1,2]（[1]筑波大・生命環境，[2]筑波大・微生物サステイナビリティ研究センター）

3A06-05　連続培養を用いた指向性進化実験による大腸菌のメバロン酸取り込み能力の強化
○村上 茉奈美[1]，川井 隆太郎[1]，前田 智也[2]，堀之内 貴明[2]，古澤 力[2]，戸谷 吉博[1]，清水 浩[1]（[1]大阪大，[2]理化学研究所）

3A06-06　Hybrid-type G protein-coupled receptors AoGprK and AoGprR play important roles for cellular development in *Aspergillus oryzae*
○KIM DONG MIN[1]，YAMADA Ryota[1]，YOSHIDA Minoru[1,2,3]，ARIOKA Manabu[1,2]（[1]Dept. Biotechnol., Univ. Tokyo，[2]CRIIM, UTokyo，[3]RIKEN CSRS）

3A06-07　*Aspergillus oryzae* における G タンパク質共役型受容体の機能および関連タンパク質との相互作用に関する解析
○山田 亮太[1]，金 東珉[1]，吉田 稔[1,2,3]，有岡 学[1,2]（[1]東大院農・応生工，[2]東大・微生物連携機構，[3]理研環境資源セ）

3A06-08　Functional analysis of secretory phospholipases A2 derived from filamentous fungi
○HUANG Sha[1]，SEKIGUCHI Eri[1]，YOSHIDA Minoru[1,2,3]，ARIOKA Manabu[1,2]（[1]Dept. Biotechnol., Univ. Tokyo，[2]CRIIM, UTokyo，[3]RIKEN CSRS）

3A06-09　黄麹菌 *Aspergillus oryzae* のハイドロフォービン HypH の機能解析
○金井 優斗，安藤 裕人，菅家 あかり，中島 春紫（明治大農・農化）

3A06-10　アカパンカビにおける SLX1-SLX4 ヌクレアーゼの同定と機能解析
○塚田 耕太郎，吉原 亮平，畠山 晋，田中 秀逸（埼玉大・院理工）

3A06-11　循環型汚水浄化槽にいる脱窒菌の探索および脱窒の効率化に向けた検討
○政岡 修平，鈴木 智順（東理大応生）

3A06-12　循環型汚水浄化槽に由来する複合微生物系内での易分解性有機物分解抑制細菌の微生物生態学的研究
○石田 望，鈴木 智順 （東理大理工）

3A06-13　循環型汚水浄化槽におけるセルロース分解微生物の機能解析
○下村 和正，鈴木 智順 （東理大理工）

3A06-14　循環型汚水浄化槽から分離された代謝産物要求細菌の系統解析と代謝産物生産細菌との対応関係の解析
○野村 拓哉，鈴木 智順 （東理大）

3A06-15　循環型汚水浄化槽の難培養細菌が生育に必要とする物質の探索と解明
○鍵山 貴大，鈴木 智順 （東理大理工）

3A06-16　アミノ酸添加が循環型汚水浄化槽内の微生物や浄化能に与える影響の解析
○野口 滉矢，鈴木 智順 （東理大理工）

ミーティングルームB 質疑応答コアタイム 9:30～10:00

微生物―代謝 - 代謝調節，発酵生理，メタボローム / 細胞 - 情報伝達，細胞応答，ストレス応答 / その他―

3B02-01　*Selenomonas ruminantium* subsp. *lactilytica* TAM6421 株の乳酸資化時におけるエネルギー生産
○吉井 直毅[1]，樋口 敬太[1]，小野寺 智子[2]，阿部 直樹[1]，金子 淳[1]
([1]東北大農，[2]名寄市立大保)

3B02-02　*Selenomonas ruminantium* subsp. *lactilytica* TAM6421 株 由来 乳酸デヒドロゲナーゼの酵素化学的諸性質の解析
○土屋 果織，武田 慶胤，阿部 直樹，金子 淳 （東北大農）

3B02-03　大腸菌における代謝ステート遷移機構の解析：2- オキソグルタル酸デヒドロゲナーゼ活性化における酢酸とリポ酸化の役割
○中澤 昂太[1]，田中 寛[2,3] ([1]東京工業大学生命理工学院生命理工学系，[2]東京工業大学生命理工学研究科，[3]東京工業大学化学生命科学研究所)

3B02-04　*Corynebacterium glutamicum* のクエン酸シンターゼ活性低下変異によるリジン生産効率の向上機構の解明
○大塚 萌音[1]，郭 朕[1]，佐藤 桃梨[1]，愛甲 徹[1]，柳瀬 真紀[1]，吹谷 智[1]，和田 大[2]，横田 篤[1] ([1]北大院農，[2]摂南大農)

3B02-05　*Corynebacterium glutamicum* のリジン生産に対するピルビン酸カルボキシラーゼおよびホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ反応の寄与度の比較
○新森 彰信[1]，郭 朕[1]，吹谷 智[1]，和田 大[2]，横田 篤[1] ([1]北大院農，[2]摂南大農)

3B02-06　糖消費速度の変化に応答して発現変動する代謝遺伝子の解析
山口 陽[1]，豊田 晃一[2]，和田 大[3]，乾 将行[2]，横田 篤[4]，
○柘植 陽太[1,5] ([1]金沢大院自然，[2]RITE，[3]摂南大農，[4]北大院農，[5]金沢大新学術)

3B02-07　緑茶摂取によって増加する *Flavonifractor plautii* の経口投与は IL-17 の抑制を介して急性大腸炎からの回復を促進する
○三上 彩音[1,2]，荻田 佑[2]，重盛 駿[2]，下里 剛士[2] ([1]信州大院生命医工学，[2]信州大バイオメディカル研)

3B02-08　抗生物質が土壌の性質に与える影響の解析
○林 大稀[1,2]，向井 慶一郎[1,3]，小林 桃子[1,2]，保坂 毅[1,2] ([1]信州大院・バイオメディカル研，[2]信州大院・総合理工，[3]信州大院・総合医理工)

3B02-09　生物学的処理および光触媒・Boron-doped diamond 電極ハイブリッド式汚水浄化システムの構築と環境影響評価
○久保田 智紀[1]，井手口 真理[1]，佐藤 俊樹[1]，落合 剛[2,3]，
藤嶋 昭[2]，鈴木 智順[1,2] ([1]東理大応生，[2]東理大総研，[3]KISTEC)

3B02-10　JFIC 細菌検査技能評価試験の 15 年　- 技能試験データの傾向と推移 -
○三山 九美，橘田 規，澤田 千尋，廣田 雅光，千葉 博 （日本食品検査）

3B02-11　出芽部位決定における *Saccharomyces cerevisiae* のシグナリング・ムチン Hkr1p の機能
○今藤 俊宏，奥澤 幹気，小澤 良太郎，伊藤 真広，笠原 紳 （宮城大食産業）

3B02-12　Pib2 は TORC1 を直接活性化する細胞内グルタミンセンサーである
○谷川 美頼[1]，山本 勝良[2]，長門石 曉[2]，津本 浩平[2]，能代 大輔[3]，野田 展生[3]，永田 宏次[2]，前田 達哉[1,2] ([1]浜松医科大学，[2]東京大学，[3]微生物化学研究所)

3B02-13　酵母ユビキチンリガーゼ Rsp5 の C2 ドメインを介したエンドサイトーシス調節機構
○棚橋 亮弥，Tira Siti Nur Afiah，西村 明，高木 博史 （奈良先端大・バイオ）

3B02-14　出芽酵母の RTG 経路の活性化は，ジヒドロスフィンゴシンの細胞毒性を増強する
○高山 千廣，古賀 綾乃，有田 頌彬，坂本 理沙，谷 元洋 （九州大理）

3B02-15　エタノールストレスからのリカバリーにおける Btn2 分解機構と天然変性領域の役割
○清水 涼，井澤 真吾 （京工繊大応生）

3B02-16　エタノールストレス下の酵母プロテオスタシスにおける細胞内トレハロースの寄与
○今井 竣也，Vo Nguyet，福田 志津，井澤 真吾 （京工繊大応生）

3B02-17　新規たばこ製品の化学的および生物学的特性
○福島 俊朗，伊藤 浩士，堺 優花，海谷 京香，高橋 智裕，橋爪 恒夫 （日本たばこ産業株式会社）

ミーティングルームB 質疑応答コアタイム 10:30～11:00

微生物―遺伝子 - ゲノム解析，メタゲノム，プロテオーム，バイオインフォーマティクス / 物質生産 - 酵素，タンパク質 / 細胞 - 栄養，生育，増殖―

3B04-01　同一不和合性群に属する塩基組成の異なるプラスミドの宿主域比較
○徳田 真穂[1]，鈴木 治夫[2]，雪 真弘[3]，大熊 盛也[3]，金原 和秀[1]，新谷 政己[1,3,4] ([1]静大院・総合科技，[2]慶大・環境情報，[3]理研・BRC-JCM，[4]静大・グリーン研)

3B04-02　黄麹菌 Aspergillus oryzae の GPI アンカー型アスパラギン酸プロテアーゼ oryzapsin の機能解析
○清水 奈津乃，山形 洋平 （東京農工大学）

3B04-03　Comparative genomic analysis of the Pink Pigmented Facultative Methylotrophs (PPFM)
○Alessa Ola[1]，Sahin Nurettin[2]，Ogura Yoshitoshi[3]，
Hayashi Tetsuya[4]，Tani Akio[1] ([1]IPSR, Okayama Univ.，[2]Fac. Edu., Mugla Sitki Kocman Univ.，[3]Dep. Infect. Med., Kurume Univ.，[4]Grad. Sch. Med. Sci., Kyushu Univ.)

3B04-04　バイオ x デジタル：スマートセルプロジェクトで得られた生産性データ・オーミクスデータの DB 化
○外内 尚人[1]，北橋 優子[1]，木村 明音[1]，光山 統泰[2]，市川 夏子[1] ([1]製品評価技術基盤機構，[2]産業技術総合研究所)

3B04-05　麹菌 *Aspergillus oryzae* が有する特異的な染色体領域の発見とゲノム編集技術 CRISPR/Cas9 による大規模欠損
○知見 悠太[1]，山口 勝司[2]，齋藤 直也[1]，片山 琢也[1,3]，
重信 秀治[2]，丸山 潤一[1,3] ([1]東大院・農生科・応生工，[2]基生研，[3]東大 微生物連携機構)

3B04-06　コリネ型細菌を宿主とする誘導発現系の構築
○山本 修也[1]，泉 悠樹[1]，積田 悠平[1]，加藤 雄己[2]，川崎 寿[3]，夏目 亮[1,2] ([1]東電大院・工，[2]東電大・工，[3]東大・生物工学セ)

3B04-07　コリネ型細菌誘導発現系を用いた組換え発現
○泉 悠樹[1]，山本 修也[1]，積田 悠平[1]，加藤 雄己[2]，川崎 寿[3]，夏目 亮[1,2] ([1]東電大院・工，[2]東電大・工，[3]東大・生物工学セ)

3B04-08　*Paenibacillus* 属由来の新規 GH43 β - キシロシダーゼの特性
○伊藤 太一[1]，中野 咲梨[2]，白﨑 里菜[3]，梅川 碧里[1]，苅田 修一[1]
([1]三重大院生物資源，[2]三重大生物資源，[3]三重大院地域イノベーション)

3B04-09　*Streptomyces* sp. 1355 由来グルコースオキシダーゼの精製と諸性質
○増田 佳南，谷 修治，炭谷 順一，川口 剛司 (阪府大院・生環科)

3B04-10　A breeding strategy of ribosome engineering for probiotics enhances the adhesion to human colonic mucin in *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG
○NAMAI Fu，SHIGEMORI Suguru，SHIMOSATO Takeshi
(IBS., Shinshu Univ.)

3B04-11　*Stenotrophomonas maltophilia* エステラーゼの活性解析と機能向上の試み
○前田 謙太郎[1]，矢田 凪紗[2]，土橋 大地[1]，阿野 貴司[1,2]，
岡南 政宏[1,2] ([1]近畿大院・生物理工，[2]近畿大・生物理工)

3B04-12　枯草菌の加熱損傷芽胞の発育過程における Thymol の抑制作用の解析
○岡田 太地[1]，朝田 良子[1,2]，坂元 仁[2]，土戸 哲明[2]，古田 雅一[1,2]
([1]大阪府大院・工・量子，[2]大阪府大・研究推進機構・微制研セ)

3B04-13　UV-C 処理芽胞の発育動態解析に基づく損傷評価
○朝田 良子[1,2]，堀切 茂俊[2]，秋吉 優史[1]，坂元 仁[2]，土戸 哲明[2]，
古田 雅一[1,2] ([1]大阪府大院・工，[2]大阪府大・研究推進機構・微制研セ)

3B04-14　枯草菌の発芽レセプター損傷芽胞の解析
○坂元 仁[1,2]，朝田 良子[2,3]，古田 雅一[2,3]，土戸 哲明[2] ([1]関西大化生工，[2]大阪府立大微制研セ，[3]大阪府立大院工量子)

3B04-15　細菌の糸状成長に必須な鞘形成メカニズムの解明
○小野 絵里香[1]，山本 達也[3]，杉本 真也[2]，
歌田 アンドリュー　シンイチ[3,4]，久能 樹[3]，野村 暢彦[3] ([1]筑波大学生命環境，[2]東京慈恵会医科大学医学，[3]筑波大学生命環境系，[4]筑波大学MiCS)

3B04-16　*Corynebacterium glutamicum* の膜小胞を介した鉄獲得の解析
○川島 花雪[1]，永久保 利紀[2]，野村 暢彦[3,4]，豊福 雅典[3,4] ([1]筑波大・生命環境，[2]東京大・農学生命科学，[3]筑波大・生命環境系，[4]筑波大・MiCS)

ミーティングルームB 質疑応答コアタイム 13:30～14:00

微生物―細胞 - 栄養，生育，増殖 / 遺伝子 - 発現制御，トランスクリプトーム / 物質生産 - 発酵（二次代謝産物，抗生物質，ペプチド，生理活性物質）―

3B07-01　コムラサキシメジ菌糸体によるフェアリー化合物産生のための至適培養条件の探索
○小堀 一[1]，竹村 太秀[2]，呉 静[3]，多田 有人[1]，河岸 洋和[2,3] ([1]岩出菌学研究所，[2]静大院・創造，[3]静大・グリーン研)

3B07-02　アクチン依存的な核移動による分裂酵母 M 期カタストロフからの回避機構
○湯川 格史[1,2]，登田 隆[1,2] ([1]広島大・院統合生命，[2]広島大・健康長寿研究拠点)

3B07-03　分裂酵母のオキシリピンを介した窒素代謝に関わる細胞間コミュニケーションの解明
○橋本 莉央[1,2]，八代田 陽子[1]，大澤 晋[1,3]，平井 剛[4]，森山 裕充[2]，
吉田 稔[1,5,6] ([1]理研CSRS・ケミカルゲノミクス，[2]東京農工大院・農，[3]Friedrich Miescher Institute for Biomedical Research，[4]九州大院・薬，[5]東大院農・応生工，[6]東大　微生物連携機構)

3B07-04　トリプトファンの蓄積による細胞壁ストレス応答への影響
○大橋 一登 (群馬大生調研)

3B07-05　出芽酵母のトランスポーターと予想される寿命延長因子 Ssg1 の機能解析
○益村 晃司[1]，金井 宗良[2]，河田 美幸[3,4,5]，関藤 孝之[3,4]，
曽我 朋義[6]，水沼 正樹[1] ([1]広島大院・統合生命，[2]酒総研，[3]愛媛大院・農，[4]愛媛大・PROS，[5]愛媛大・学術支援，[6]慶應大・先端生命)

3B07-06　有性生殖誘導に対する黄麹菌 *Aspergillus oryzae* の応答
○峯岸 悠也，丸山 洋平，倉科 瑛衣，加藤 朝子，山形 洋平 (農工大院応生化)

3B07-07　Glucuronoyl esterase stimulates biomass degradation by triggering hydrolytic responses in *Neurospora crassa*
○WANG Ruijie[1]，YANO Takuya[1]，YOSHIDA Minoru[1,2,3]，
ARIOKA Manabu[1,2] ([1]Dept. Biotechnol., Univ. Tokyo，[2]CRIIM, UTokyo，[3]RIKEN CSRS)

3B07-08　*Cordyceps militaris* が産生するコルジセピンのカイコ幼虫へ与える影響
○西村 このみ[1]，池尾 一穂[2]，朴 龍洙[3]，加藤 竜也[3] ([1]静大・創科技院，[2]遺伝研・ゲノム進化，[3]静大・グリーン研)

3B07-09　*Streptomyces* 属放線菌 Y2944 の セルロース資化に寄与する遺伝子の解析
○日比野 竜粛，丸目 浩太郎，牟田口 祐太，小林 正之，
小嶋 郁夫，春日 和 (秋田県大院生資科)

3B07-10　出芽酵母ロンボイド Pcp1p の生理機能解明と基質探索
○角田 俊揮，日高 將文，小川 智久，新谷 尚弘，二井 勇人 (東北大院農)

3B07-11　*Comamonas testosteroni* TA441 におけるフェノール分解遺伝子群の機能解析
○新北 大樹[1,2]，亀谷 将史[1,2]，石井 正治[1,2]，新井 博之[1,2] ([1]東大院農生科 応生工，[2]東大微生物連携機構)

3B07-12　菌類ウイルスがイネいもち病菌の二次代謝に与える影響
○二宮 章洋[1]，浦山 俊一[1,2]，周防 玲[3]，藤 晋一[4]，森山 裕充[5]，
萩原 大祐[1,2] ([1]筑波大生命環境，[2]筑波大MiCS，[3]日大生物資源，[4]秋田県大生物資源，[5]東農工大農)

3B07-13　白癬菌が産生する抗生物質 viomellein の発見と生合成経路の決定
○増田 圭恭[1]，二宮 章洋[2]，上野 圭吾[3]，中村 匠[3,4]，清水 公徳[4]，
矢口 貴志[5]，浦山 俊一[2,6]，萩原 大祐[2,6] ([1]筑波大院・生命環境，[2]筑波大・生命環境系，[3]感染研・真菌部，[4]理科大・基礎工，[5]千葉大・MMRC，[6]筑波大・MiCS)

3B07-14　糸状菌 *Aspergillus niger* における共培養誘導型の黄色色素生産とその生合成遺伝子の決定
○辻 晴佳[1]，二宮 章洋[2]，竹下 典男[2,4]，甲斐 建次[3]，浦山 俊一[2,4]，
萩原 大祐[2,4] ([1]筑波大院・生命環境，[2]筑波大・生命環境系，[3]阪府大・生命環境，[4]筑波大・MiCS)

3B07-15　天然由来抗菌物質による *Penicillium* 属菌二次代謝の覚醒とその解析
○波形 匠[1]，老木 紗予子[2]，二宮 章洋[2]，矢口 貴志[3]，
浦山 俊一[2,4]，萩原 大祐[2,4] ([1]筑波大院・生命地球，[2]筑波大・生命環境，[3]千葉大・MMRC，[4]筑波大・MiCS)

3B07-16　*Saccharomyces cerevisiae* によるテルペンアルコールからのゲラン酸とシトロネル酸の生合成
○大橋 勇敢，前田 勇 (宇都宮大農)

3B07-17　酵母 *Pichia pastoris* を宿主とした有用芳香族化合物生産プロセスの開発
○雲北 涼太，番場 崇弘，蓮沼 誠久，近藤 昭彦 (神戸大)

ミーティングルームC 質疑応答コアタイム 9:00～9:30

微生物―細胞 - 情報伝達，細胞応答，ストレス応答 / 物質生産 - 酵素，タンパク質 / その他―

3C01-01　普遍的リボヌクレアーゼ RNase T2 のリボソームによる活性制御機構の解析
○南 篤[1]，日高 真誠[1]，葛山 智久[1,2]，小川 哲弘[1,2] ([1]東大院・農生科，[2]東大・微生物連携機構)

3C01-02　大腸菌における DNA 障害後の SulA 依存性溶菌機構の主要経路
○大田 菜都子[1]，大澤 歩[1]，高坂 智之[1,2]，村田 正之[1]，中村 慶子[3]，室 龍之介[3]，山田 守[1,2,3]（[1]山口大院創科，[2]山口大中高温微研セ，[3]山口大院医）

3C01-03　細菌細胞内 pH モニタリングシステムを利用した大腸菌長期定常期のリアルタイム細胞内 pH 測定
○臼田 隆亮[1]，須藤 雅己[2]，蓮池 祐紀[3]，深田 悠太[2]，片岡 正和[2]（[1]信州大工，[2]信州大院　総合理工　生命医工，[3]信州大工　物質化学）

3C01-04　細菌細胞内 pH モニタリングシステムを利用した大腸菌細胞内 pH 調節機構の解明
○須藤 雅己[1]，臼田 隆亮[2]，蓮池 祐紀[3]，片岡 正和[1]（[1]信州大・生命医工，[2]信州大・工・技，[3]信州大・物質化）

3C01-05　大腸菌膜内切断プロテアーゼ RseP の新奇生理機能：FecR の切断を介した鉄取り込みに関わる遺伝子群の転写活性化
○横山 達彦[1]，新苗 智也[2]，津曲 和哉[2]，今見 考志[2]，石濱 泰[2]，檜作 洋平[1]，秋山 芳展[1]（[1]京大ウイルス・再生研，[2]京大院薬）

3C01-06　麹菌が産生する環状ペプチド デフェリフェリクリシンによる抗炎症・美白作用のマイクロアレイ解析および皮膚バリア機能改善効果の新規発見
○戸所 健彦，石田 博樹（月桂冠・総研）

3C01-07　CRISPR-Cas9 を用いたラビリンチュラ類のゲノム編集
○石橋 洋平，安宅 祐輔，伊東 信，沖野 望（九大院農）

3C01-08　紅麹抽出物によるコレラ菌の毒素産生に及ぼす生物活性
○新垣 梨乃[1]，比嘉 直美[2]，許 駿[2]，山城 哲[2]，橘 信二郎[1]（[1]琉球大農，[2]琉球大医）

3C01-09　有機触媒グラナチシンは特異的タンパク質と結合して細胞外に存在する
○長安 伶奈，榎本 成美，西山 辰也，上田 賢志（日大生資科）

3C01-10　黄麹菌の転写因子 MalR の構造・機能解析に向けた発現系の構築
○小嶋 慧，小川 智久，二井 勇人，五味 勝也，日高 將文（東北大・院農）

3C01-11　*Aspergillus oryzae* における菌体内 metalloendopeptidase insulysin ホモログの局在解析
○小川 翠，溝上 哲哉，鈴木 遥，佐々木 信光，山形 洋平（農工大院応生化）

3C01-12　麹菌および植物病原糸状菌における各炭素源特異的な SSPs の同定
○寺内 裕貴[1,2]，吉田 裕史[1]，田中 千尋[1,2]，本田 与一[1]，河内 護之[1]，吉見 啓[1]（[1]京大農，[2]京大学堂）

3C01-13　麹菌の菌糸接着因子制御株を用いた酵素生産向上と培養液流動性の改善
○市川 暉[1]，加藤 好一[2]，宮澤 拳[1]，田畑 風華[1]，古明地 敬介[1]，吉見 啓[3,4]，阿部 敬悦[1,4]（[1]東北大農，[2]佐竹化学攪拌技術研，[3]京大院農，[4]東北大NICHe）

3C01-14　ハイドロフォビン RolA の Langmuir 膜に対するポリエステラーゼ CutL1 特異的吸着の検出系確立
○齋藤 有美[1]，寺内 裕貴[2]，吉見 啓[2]，田中 拓未[3]，三ツ石 方也[4]，藪 浩[5]，阿部 敬悦[1]（[1]東北大農，[2]京都大農，[3]農研機構，[4]東北大工，[5]東北大材料科学）

ミーティングルーム C 質疑応答コアタイム 10:00～10:30

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

3C03-01　*Aspergillus oryzae* 001 を用いたアワビ内臓発酵物の IL-12 産生誘導による免疫調整機能
○竹谷 佳弥乃[1]，舞沢 友昭[2]，濱田 奈保子[1]（[1]東京海洋大院・食品流通安全管理，[2]ブルドックソース株式会社）

3C03-02　植物性発酵乳における菌体外多糖の免疫活性
○仲田 創[1,2]，友清 帝[2,3]，北原 秀悟[2,3]，平光 正典[1]，井上 孝司[1]，北澤 春樹[2,3]（[1]ポッカサッポロフード＆ビバレッジ株式会社，[2]東北大・院・農，[3]CFAI）

3C03-03　ヒト単球細胞株 THP-1 から分化誘導した M1 型マクロファージの Toll-like receptor7/8 アゴニストに対する免疫応答性
○飛田 啓輔，小田木 美保（茨城産技セ）

3C03-04　植物マイクロ RNA の肺線維化抑制作用
○山本 真生[1]，疋田 愛[1]，小川 史代[1]，島田 優[1]，熊添 基文[1]，藤村 由紀[1]，中曽根 光[2]，米倉 円佳[2]，立花 宏文[1]（[1]九大院農院・生機科，[2]トヨタ自動車・アグリバイオ事業部）

3C03-05　*Lactobacillus plantarum* OLL2712 株の経口投与が高脂肪食を摂取したマウス体内における抗炎症作用を発揮する経路の検討
○王 イバイ[1]，高野 智弘[1]，周 英ギョク[2]，王 蓉[1,2]，田之倉 優[1,2]，宮川 拓也[2]，足立(中嶋) はるよ[1]，八村 敏志[1]（[1]東大院農生科・食の安全研セ，[2]東大院農生科・応生化）

3C03-06　緑茶カテキン EGCG はマクロファージにおいて 67-kDa laminin receptor 依存的に miRNA 発現を調節し抗炎症作用を発揮する
○西岡 成汰，冨岡 玲乃，小原井 春香，村田 京介，福富 拓哉，山田 脩平，熊添 基文，藤村 由紀，立花 宏文（九大院農院・生機科）

3C03-07　ターメリックオイルが高脂肪食給餌マウスの脂質代謝並びに肥満に及ぼす影響
○荒井 孝志[1]，青木 勇樹[1]，奥江 紗知子[2]，三浦 徳[3]，増澤(尾﨑) 依[1]，細野 崇[1,2]，関 泰一郎[1,2,3]（[1]日大・生資科・生命化，[2]日大・生資科・応生科，[3]日大・生資科・総合研究所）

3C03-08　ビタミン A 代謝変動を介して NAFLD 発症を予防する玄米成分の探索
○本郷 篤一[1]，松本 雄宇[2]，鈴木 司[2]，井上 順[1,2]，山本 祐司[1,2]（[1]東農大院・応生科・農化，[2]東農大・応生科・農化）

3C03-09　野沢菜漬け由来乳酸菌 N-07 株と野沢菜粉末による肥満抑制効果の解析
○田中 佑奈，澤 陶有子，中嶋 茜，浅見 拓哉，遠藤 勝紀，吉倉 陽華，松井 莉奈，田中 沙智（信州大農）

3C03-10　アントシアニン類によるスフィンゴシンキナーゼ発現制御に関する研究
○上野 有紀[1]，加藤 結衣[1]，杉山 遥香[1]，中野 未紗樹[1]，川本 善之[2]，大澤 俊彦[1]（[1]愛知学院大心身科学，[2]中部大生命健康）

3C03-11　腸内環境および免疫機能に及ぼすあまおう乳酸菌およびフコイダンの摂食効果
○篠田 あかり[1]，朴 俊夏[1]，中野 勇人[3]，柴崎 哲哉[3]，宮﨑 義之[1,2]，中山 二郎[1]（[1]九大院農，[2]NPOフコイダン研究所，[3](株)ヴェントゥーノ）

3C03-12　腸炎モデルマウスにおける脳での炎症に対するカルノシン酸の影響
○海野 美月[1]，海切 弘子[2]，萱島 知子[3]，柴田 紗知[4]，松原 主典[1,5]（[1]広大院教育，[2]広島文化学園大，[3]佐賀大教育，[4]福山大薬，[5]広大院人間）

3C03-13　メスマウスにおけるダイゼインによるヒラメ筋の肥大促進における *S*- エクオールの関与
○佐々木 里那，河田 夏初，原田 直樹，山地 亮一（大阪府大院生命環境）

ミーティングルームC 質疑応答コアタイム 11:00～11:30

English Session―有機化学，天然物化学 / 食品―

3C05-01 Two new octahydronaphthalene derivatives, trichodermic acid C and D produced by *Trichoderma* sp. HN-1.1
○Sofian Ferry Ferdiansyah[1,2]，Warahapsari Fatimah Ayu[3]，Koseki Takuya[4]，Shiono Yoshihito[4]（[1]The United Graduate School of Agricultural Sciences, Iwate University，[2]Faculty of Pharmacy, Universitas Padjadjaran，[3]Faculty of Forestry, Universitas Gadjah Mada，[4]Faculty of Agriculture, Yamagata University）

3C05-02 Flavonol Glycosides from Jack Bean（*Canavalia ensiformis*（L.）DC: Identification and α-Glucosidase Inhibition Characteristic
○SUTEDJA Anita Maya[1,2,3]，YANASE Emiko[1]，BATUBARA Irmanida[2]，FARDIAZ Dedi[2]，LIOE Hanifah Nuryani[2]（[1]Gifu University，[2]IPB University，[3]Widya Mandala Catholic University Surabaya）

3C05-03 Squalene novel cyclic peroxides detected on the human skin in vivo and cause damage to basal and differentiated keratinocytes in vitro（HaCaT model）.
○Khalifa Saoussane[1]，Kato Shunji[1]，Enomoto Masaru[2]，Otoki Yurika[1]，Eitsuka Takahiro[1]，Nakagawa Kiyotaka[1]（[1]Food and Biodynamic Chemistry Laboratory, Tohoku Univ.，[2]Applied Bioorganic Chemistry Laboratory, Tohoku Univ.）

3C05-05 A new approach for effective co-production of 3-hydroxypropionic acid and 1,3-propanediol
○Mojarrad Mohammad[1]，Tajima Takahisa[2]，Hida Akiko[2]，Kato Junichi[2]（[1]Department of Molecular Biotechnology, Graduate School of Advanced Sciences of Matter, Hiroshima University，[2]Program of Biotechnology, Graduate School of Integrated Sciences for Life, Hiroshima University）

3C05-06 Biosynthesis of the nucleoside-derived natural product angustmycin
○XIA Jiaqi[1]，SHIRAISHI Taro[1]，KUZUYAMA Tomohisa[1,2]（[1]GSALS, UTokyo，[2]CRIIM, UTokyo）

3C05-07 Studies on the biosynthetic machinery in secondary metabolism of *Streptomyces* to form 1-azabicyclo[3.1.0]hexane ring via aziridine ring
○KUROSAWA Sumire[1]，MATSUDA Kenichi[1]，HASEBE Fumihito[1]，TOMITA Takeo[1,2]，KUZUYAMA Tomohisa[2,3]，KOSONO Saori[1,2]，NISHIYAMA Makoto[1,2]（[1]BRC, UTokyo，[2]CRIIM, UTokyo，[3]Grad. Sch. Agri. & Life Sci., UTokyo）

3C05-08 Antibacterial, Antihyperuricemia, α-Amylase and α-Glucosidase Inhibitory Activities of of Celastrus hindsii. B
○TRAN VIET，Xuan Tran Dang（Hiroshima Univ.）

3C05-09 Mung bean peptides promote translocation of glucose transporter 4 and glucose uptake through AMPK-, JAK/STAT- and Insulin-pathways in skeletal muscle cells
○ZHANG Qing，YAMASHITA Yoko，ASHIDA Hitoshi（Kobe Univ.）

3C05-10 Fermented rice bran supplementation promoted intestinal restoration post DSS-induced inflammation
○Agista Afifah Zahra[1]，Islam Jahidul[1]，Koseki Takuya[2]，Ohsaki Yusuke[1]，Komai Michio[1]，Shirakawa Hitoshi[1]（[1]Grad. Sch. Agri. Sci., Tohoku Univ.，[2]Fac. Agri., Yamagata Univ.）

3C05-11 The effects of butyrate on immune checkpoint signaling and improvement of psoriasis
○IKEDA Hinako，SUZUKI Shodai，YASHIRO Takuya，NISHIYAMA Chiharu（Tokyo Univ. Sci.）

3C05-12 Intestinal Regulatory T Cell Induction by β-Elemene Alleviates the Formation of Fat Tissue-Related Inflammation
○ZHOU Yingyu[1,2]，TAKANO Tomohiro[1,2]，WANG Yimei[1,2]，LI Xuyang[2]，WANG Rong[1,2]，WAKATSUKI Yoshio[3]，ADACHI(NAKAJIMA) Haruyo[1,2]，TANOKURA Masaru[1,2]，MIYAKAWA Takuya[2]，HACHIMURA Satoshi[1,2]（[1]Res. Cent. Food Safety, Univ. Tokyo，[2]Dept. Appl. Biol. Chem.,Univ. Tokyo，[3]Dept. Clin. Bio-regulatory Sci., Kyoto Univ. Grad. Sch. Med.）

3C05-13 Development of a Low-Cost GLP-1 ELISA and Screening for Plant Bio-Active Compound that Promotes GLP-1 Secretion in STC-1 cells.
○Odongo Kevin，Yamashita Yoko，Ashida Hitoshi（Kobe Univ.）

3C05-14 Ethanolamine plasmalogen attenuates DSS-induced colitis in vivo and ameliorates inflammatory stressed human intestinal tract cells in vitro by suppressing apoptosis
○BERNARD EPHANTUS[1]，Yamashita Shinji[1]，Kumagai Kei[2]，Otoki Yurika[2]，Yamamoto Ayaka[3]，Eitsuka Takahiro[2]，Nakagawa Kiyotaka[2]，Miyazawa Teruo[2]，Kinoshita Mikio[1]（[1]Obihiro Univ.，[2]Tohoku Univ，[3]Yaizu Suisankagaku Ind.）

3C05-15 Geranylgeraniol attenuates lipopolysaccharide-induced inflammation in MG6 mouse microglial-derived cells
○SAPUTRA WAHYU DWI，OHSAKI YUSUKE，KOMAI MICHIO，SHIRAKAWA HITOSHI（Lab. Nutr., Grad. Sch. Agri. Sci., Tohoku Univ.）

3C05-16 Sugar, organic acid, and MS-e-nose properties of non-centrifugal cane sugars from Japan and ASEAN countries
○ASIKIN Yonathan[1]，WADA Koji[1]，TSUCHIDA Eito[2]，MAEDA Goki[2]，NAM Vu Tuan[3]，AYUSTANINGWARNO Fitriyono[4]，HAJAR-AZHARI Siti[5]（[1]Faculty of Agriculture, University of the Ryukyus，[2]Regional Agricultural System Section, Okinawa Prefectural Agricultural Research Center，[3]Institute of Genome Research, Vietnam Academy of Science and Technology，[4]Faculty of Medicine, Diponegoro University，[5]Faculty of Food Science and Technology, University Putra Malaysia）

ミーティングルームC 質疑応答コアタイム 13:00～13:30

微生物―細胞 - 複合微生物，共生微生物，難培養性微生物 / 物質生産 - 醸造，発酵（一次代謝産物）/ 遺伝子 - 発現制御，トランスクリプトーム―

3C06-01 並行複式無機化法による病原性フザリウムに対しての病害抑止土壌の生成
ミーブン ジャムジャン[1]，藤原 和樹[1]，宮本 憲二[2]，加藤 康夫[3]，安藤 晃規[4,5]，小川 順[4,5]，○篠原 信[1]（[1]農研機構，[2]慶大理工，[3]富山県大・生医工研セ，[4]京大院農，[5]京大・生理化学研究ユニット）

3C06-02 ヤマブシタケ抽出物に含まれる歯周病原性細菌*Eikenella corrodens*のバイオフィルム阻害タンパク質の精製と解析
○阿座上 弘行，濱治 百々子，TANIGUCHI Shogo，IIDA Ryohei（山口大農）

3C06-03 ニホンミツバチ由来乳酸菌の単離と諸性質の解析
○櫻間 晴子[1]，吉崎 泰貴[1]，坂本 文夫[1,2]，萩下 大郎[1]（[1]京都先端大バイオ環境，[2]京都ニホンミツバチ研究所）

3C06-04 蛍光タンパク質を発現させた*Methylobacterium*属細菌のアカシソ上での動態解析
○片山 志織[1]，由里本 博也[1]，谷 明生[2]，阪井 康能[1]（[1]京大院農，[2]岡山大植物研）

3C06-05　なぜ培養困難なのか？難培養性微生物 *Nitrospira* の未知増殖制御機構に迫る
○定廣 晋吾[1]，田村 淳[1]，村上 千穂[2]，加藤 節[1]，中島田 豊[1]，金田一 智規[1]，大橋 晶良[1]，青井 議輝[1]　([1]広島大，[2]安田女大)

3C06-06　麹菌固体培養による日本ワインパミス成分の高機能化
○奥川 日菜乃[1]，橋本 敦子[1]，三宅 剛史[2]，伊藤 一成[2]，谷野 有佳[2]，山下 秀行[3]，中川 拓郎[3]，平野 幸司[4]，仁戸田 照彦[1]，神崎 浩[1]　([1]岡山大院・環境生命，[2]岡山県工技セ，[3]樋口松之助商店，[4]果実工房)

3C06-07　麹菌固体培養によるオリーブ葉成分の高機能化
○橋本 敦子[1]，奥川 日菜乃[1]，三宅 剛史[2]，伊藤 一成[2]，谷野 有佳[2]，山下 秀行[3]，内田 真美[3]，三木 翔平[3]，吉田 靖弘[4]，徐 恵美[4]，菊地 敬一[4]，仁戸田 照彦[1]，神崎 浩[1]　([1]岡山大院・環境生命，[2]岡山県工技セ，[3]樋口松之助商店，[4]日本オリーブ)

3C06-08　ブドウ果皮共生菌によるワインの自然発酵促進
○渡辺 大輔，橋本 渉　(京大院農)

3C06-09　麹菌糖転移酵素による清酒中オリゴ糖の生成
○金本 湧太[1]，本田 千尋[1]，竹久 まや[2]，小林 泉美[1]，勝田 亮[3]，松村 聡美[4]，我妻 いずみ[1]，進藤 斉[1]，穂坂 賢[1]，額田 恭郎[3]，徳岡 昌文[1]　([1]東農大院農，[2]東農大院応生，[3]東農大生命，[4]東農大応生)

3C06-10　発酵食品データベースのアクセス動向と使用法について
○楠本 憲一，曲山 幸生　(農研機構)

3C06-11　従属栄養硝化菌 *Alcaligenes faecalis* におけるピルビン酸オキシムジオキシゲナーゼ遺伝子の発現制御
○辻野 修平[1]，道羅 英夫[2]，藤原 健智[1]　([1]静大院・創造，[2]静大・グリーン研)

3C06-12　Lrp/AsnC 型転写制御因子によるアミノ酸異化代謝系制御機構の解明
○金井 保，丸山 凌，谷本 充，Liu Rengwei，吉田 晃，山本 康之，跡見 晴幸　(京大院工)

3C06-13　低温耐性細菌 *Exiguobacterium undae* Su-1 株が産生する細胞外プロテアーゼ EuPrt の遺伝子発現に関する研究～Ca^{2+} による *euPrt* 転写の促進～
○荒川 清明，原田 順子，渡部 邦彦　(京府大・院生環)

3C06-14　コリネ型細菌における RNase J の発現制御解析
○田中 裕也[1]，濱本 渚[2]，澤 誠人[2]，乾 将行[1,2]　([1]RITE，[2]奈良先端大・バイオ)

3C06-15　コリネ型細菌における RNase III の発現制御解析
○澤 誠人[1,2]，田中 裕也[2]，乾 将行[1,2]　([1]奈良先端大・バイオ，[2]RITE)

3C06-16　*Corynebacterium glutamicum* を用いた物質生産を指向した誘導プロモーターの探索
○小林 雅規[1,2]，久保田 健[2]，乾 将行[1,2]　([1]奈良先端大・バイオ，[2]RITE)

ミーティングルームD 質疑応答コアタイム 9:30～10:00

食品―食品機能・栄養 - 免疫，炎症 / 食品機能・栄養 - 脂質代謝，糖質代謝 / 食品機能・栄養 - 癌，抗癌―

3D02-01　米由来グルコシルセラミドの消化管動態および抗炎症メカニズムの検証
○田中 駿，曽我 みちる，山下 慎司，木下 幹朗　(帯畜大)

3D02-02　腸間膜リンパ節樹状細胞の抗原提示による T 細胞分化に対する乳酸菌 *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* YRC3780 の作用機序
○中川 稜悟[1]，顧 文テイ[1]，高野 智弘[1]，王 イバイ[1]，宇野 智[1]，森永 真実子[1]，内田 健治[2]，元島 英雅[2]，片野 直哉[2]，足立(中嶋) はるよ[1]，八村 敏志[1]　([1]東大院農生科・食の安全研セ，[2]よつ葉乳業・中央研)

3D02-03　大腸腺腫発症モデルマウスにおける食用キノコ(タモギタケ)脂溶性画分が ACF 発症に与える影響
○石川 愛理[1]，上田 瑠南[1]，山下 慎司[1]，松本 聡[2]，木下 幹朗[1]　([1]帯畜大，[2]LSコーポレーション)

3D02-04　ロスマリン酸摂取によるアルツハイマー病予防効果に伴い変動する microRNA のミクログリアに対する機能解析
○貫間 春圭[1]，家山 智子[1]，長谷 知輝[1]，山下 玲[1]，山田 正仁[2]，三坂 巧[1]，阿部 啓子[1,3]，小林 彰子[1]　([1]東大院農，[2]金沢大院医，[3]産技総研)

3D02-05　小腸刷子細胞におけるイメージング法の構築
○朝比奈 瞭[1]，楠 真友子[1]，戸田 安香[1]，安達 貴弘[2]，石丸 喜朗[1]　([1]明大農，[2]東京医科歯科大学)

3D02-06　トマト種子抽出物および含有サポニンの角層セラミド合成および保湿機能に及ぼす影響
○竹田 翔伍，宮坂 賢知，下田 博司　(オリザ油化株式会社)

3D02-07　高度不飽和脂肪酸欠乏における肝臓の中性脂肪及びコレステロールの合成亢進と制御機構
○林 優里[1]，藤原 葉子[2,3]，市 育代[2,3]　([1]お茶大院・ライフ，[2]お茶大・基幹研究院，[3]お茶大・HLI研)

3D02-08　メチオニン低減，コリンの欠乏が非アルコール性脂肪性肝疾患モデルマウスのリポプロテインプロファイルに及ぼす影響
○川手 啓吾[1]，小坂 浩輝[1]，三浦 徳[3]，増澤 (尾崎) 依[2]，細野 崇[1,2]，関 泰一郎[1,2,3]　([1]日大院・生資科・応生科，[2]日大・生資科・生命化，[3]日大院・生資科・総合研究所)

3D02-09　腸肝循環における 12 α水酸化胆汁酸の増加による腹腔内耐糖能試験でのインスリン分泌減少
○横山 史佳，吉次 玲香，石塚 敏　(北海道大学農)

3D02-10　微生物由来プラスマローゲンのラット小腸におけるリンパ吸収動態
○佐藤 奈々[1]，金濱 晶[1]，柏木 明子[2]，山田 美和[1]，西向 めぐみ[1]　([1]岩手大・農，[2]弘前大・農学生命)

3D02-11　ブルーベリー葉抽出物のα - アミラーゼ阻害物質の探索
○松本 悠[1]，矢野 善久[1]，山﨑 正夫[2]，藤田 裕之[1]　([1]京都先端科学大学バイオ環境，[2]宮崎大学農)

3D02-12　硫酸化糖脂質代謝に与える短鎖脂肪酸の影響
○中嶌 岳郎[1]，中田 勉[2]，田中 直樹[1]　([1]信州大医，[2]信州大基盤研究支援センター)

3D02-13　Arctigenin，Nobiletin による相乗的抗腫瘍活性の分子機構の解明
○仲宗根 侑花，岩崎 公典，屋 宏典　(琉球大学)

3D02-14　仏手柑由来クマリン類のアポトーシス誘導物質とその作用機構
○夏見 弥侑，奥野 祥治　(和歌山高専)

3D02-15　食品由来機能性微粒子 EPDENs の乳がん抑制作用と活性成分の探索
○山崎 有美[1]，松本 朋子[2]，福井 敬一[3]，吉山 佳世[3]，近藤 知巳[3]，山崎 正夫[4]　([1]宮大地域，[2]宮大産学，[3]JA宮経連，[4]宮大農)

3D02-16　サツマイモ焼酎粕を用いた麹菌培養物の抽出物によるがん細胞致死作用
○小境 敏揮[1]，三浦 真帆[2]，竹下 美愛[2]，章 超[1]，河野 邦晃[1]，小川 健二郎[3]，甲斐 久博[4]，西山 和夫[2]，山﨑 正夫[2]　([1]霧島酒造，[2]宮崎大・農，[3]宮崎大・テニュアトラック推進機構，[4]九保大・薬)

3D02-17　がん細胞増殖におけるベリーの影響分析
○鈴木 晶貴[1]，水木 徹[2]，三浦 健[1,3]　([1]東洋大院生命科学，[2]東洋大学・バイオナノエレクトロニクス研究センター，[3]東洋大学・ライフイノベーション研究所)

ミーティングルームD 質疑応答コアタイム 10:30～11:00

食品―食品機能・栄養 - 免疫，炎症 / 食品機能・栄養 - 酸化，抗酸化，糖化，抗糖化，老化 / 食品機能・栄養 - メタボリック・シンドローム，エネルギー代謝―

3D04-01　OVA 特異的 T 細胞クローンマウスを用いた経口抗原に対する $CD4^+$T 細胞応答の解析
○塩原 幸[1]，五島 直樹[1]，王 イバイ[1]，中川 稜悟[1]，曽我 皓平[1]，王 蓉[1]，神沼 修[2]，足立(中嶋) はるよ[1]，八村 敏志[1]　([1]東大院農生科・食の安全研セ，[2]広大・原医研)

3D04-02　脂肪細胞の分化・成熟を抑制するマスト細胞由来因子の特性
○祖父江 春菜，高野 真衣，細萱 侑作，中西 祐輔，高橋 恭子（日本大生物資源科）

3D04-03　ピロール化タンパク質による抗 DNA 自己抗体産生機構に関する研究
○林 世映[1]，近澤 未歩[1]，板倉 正典[1]，佐々木 栄太[1]，松田 知成[2]，内田 浩二[1]（[1]東大院農生科，[2]京大RCEQM）

3D04-04　腸管内 GABA の生理的意義とその機構の解析
○池上 美音[1]，近藤 祐衣[1]，福本 凛太郎[1]，原田 岳[2]，何 方[2]，宮澤 賢司[2]，藤 佑志郎[1]，松藤 寛[1]，中西 祐輔[1]，高橋 恭子[1]（[1]日本大学生物資源，[2]タカナシ乳業株式会社商品研究所）

3D04-05　緑茶カテキン EGCG は 67-kDa ラミニン受容体を介してマクロファージの極性を調節する
○小原井 春香，冨岡 玲乃，西岡 成汰，村田 京介，福富 拓哉，山田 脩平，牧尾 彰子，藤村 由紀，立花 宏文（九大院農院・生機科）

3D04-06　クルクミンと腸内細菌および短鎖脂肪酸の共刺激がパイエル板細胞応答を修飾する
○柴崎 涼太[1]，古川 凱斗[1]，津田 真人[1]，高野 智弘[2]，王 イバイ[2]，戸塚 護[3]，八村 敏志[2]，細野 朗[1]（[1]日本大学，[2]東大院農生科・食の安全研究セ農，[3]日獣応生）

3D04-07　皮膚アンチエイジング効果をもつポリフェノールの探索とその機能性
○森山 さやか，戸高 涼花，亀田 菜月，片倉 喜範（九州大シス生）

3D04-08　食薬・油糧植物由来成分の皮膚老化改善効果
○小櫃 実由[1]，中村 水玖[1]，Meriem Ledrhem[2]，Hafida Bouamama[2]，Gadhi Chemseddoha[2]，片倉 喜範[1]（[1]九州大シス生，[2]UNIVERSITE CADI AYYAD）

3D04-09　フェルラ酸およびフェルラ酸 -4'-*O*- グルクロニドのアミロイド*β*神経細胞毒性に対する緩和効果
○外山 華恵[1]，原 崇[2]，三亀 啓吾[2]，城 斗志夫[2]，中村 澄子[3]，池内 健[4]，大坪 研一[3]（[1]新潟大院自然科学，[2]新潟大農，[3]新潟薬大応用生命，[4]新潟大脳研）

3D04-10　黒米糠摂取による老齢マウス脳組織における tau リン酸化抑制とインシュリンシグナル増強
○大畠 悠実[1]，外山 華恵[1]，原 崇[2]，池内 健[3]，中村 澄子[4]，城 斗志夫[2]，大坪 研一[4]（[1]新潟大院自然科学，[2]新潟大農，[3]新潟大脳研，[4]新潟薬大応用生命）

3D04-11　アガロオリゴ糖は *sir-2.1* を介して *Caenorhabditis elegans* の寿命を延伸する
○出坂 夏美[1]，西川 仁美[1]，水島 かつら[2]，髙木 智久[2]，内藤 裕二[2]，東村 泰希[1,2]（[1]石川県大・生資環，[2]京府医院・医）

3D04-12　ジャバラ果皮由来*α* - グルコシダーゼ阻害活性物質とその作用機構
○楠本 恵理，奥野 祥治（和歌山高専）

3D04-13　C2C12 筋芽細胞に対するサクラケムシ糞茶の筋管細胞への分化促進効果
○高橋 有志[1,2]，吉田 泉[2]，藤田 和弘[2]，五十嵐 友二[2]，井内 良仁[1]（[1]山口大，[2]日本食品分析センター）

3D04-14　糖質を用いた非アルコール性脂肪肝の *in vitro* モデル系の構築および解析
○太田 晴佳[1]，波津 優花[2]，本松 由衣[1]，薩 秀夫[1]（[1]前橋工大工，[2]前橋工大院工）

3D04-15　アカメガシワ由来ポリフェノール，ベルゲニンのSIRT1/PGC-1 *α*経路を介したミトコンドリア新生促進作用の解明
○永良 祐樹[1]，赤川 貢[1]，内藤 健太郎[2]（[1]大阪府大院・生命環境，[2](株)ディーエイチシー）

ミーティングルームD 質疑応答コアタイム 13:30～14:00

食品―食品工学 - 製造工学，加工学 / 食品工学 - 物性，分析 / 食品工学 - その他―

3D07-01　月桃由来 DK 及び DDK 高純度原料の製造法とその生物活性
○山野 亜紀[1]，戸井田 佳子[2]，中村 太郎[2]，夏目 敬行[3]，渡辺 章夫[4]，米澤 貴之[4]，照屋 俊明[3]，禹 済泰[2]（[1]琉球大学教育学部，[2]中部大学応用生物学部，[3]琉球大学大学院理工学研究科，[4]中部大学生物機能開発研究所）

3D07-02　オーバーミキシングがケーキ生地の物性と構造に及ぼす影響
○平野 晴菜[1]，増子 朝貞[2]，今泉 鉄平[1]，勝野 那嘉子[1]，西津 貴久[1]（[1]岐阜大学，[2]三菱ケミカルフーズ株式会社）

3D07-03　乳化剤がパンケーキ中の小麦澱粉糊化および老化特性に及ぼす影響
○永田 幹太朗[1]，勝野 那嘉子[2]，中川 奈菜[3]，今泉 鉄平[2]，西津 貴久[2]（[1]岐阜大院・自然研，[2]岐阜大・応生，[3]株式会社日清製粉グループ本社）

3D07-04　酵素添加が冷凍米飯の老化特性に及ぼす影響
○國枝 美沙[1]，橋本 朋子[2]，勝野 那嘉子[3]，今泉 鉄平[3]，西津 貴久[3]（[1]岐阜大院・自然研，[2]日本水産株式会社，[3]岐阜大・応生）

3D07-05　沈降静水圧測定による米粉パン生地物性の評価
○池田 紗南，今泉 鉄平，勝野 那嘉子，西津 貴久（岐阜大）

3D07-06　米粉バッターのホイッピング特性に関する現象論的解析
○石川 大太郎[1]，市川 千晶[2]，楊 嘉敏[2]，藤井 智幸[2]（[1]福島大食農，[2]東北大農）

3D07-07　TDS による冷菓の食感特徴評価
○太田 美樹，石原 清香，後藤 佳代，栗田 真衣，中馬 誠，船見 孝博（三栄源エフ・エフ・アイ(株)）

3D07-08　LC-MS/MS による麻痺性貝毒分析
○橘田 規[1]，佐野 勇気[1]，小林 まなみ[2]，高橋 洋武[1]，渡邉 淳[2]，照井 善光[1]（[1]日本食品検査，[2]島津製作所）

3D07-09　ナスに含まれる新規食品機能性成分アセチルコリンの加熱調理による含有量変化
○王 文豪[1]，和具 なおみ[3]，宮武 宏治[2]，山口 翔平[1]，中村 浩蔵[3]（[1]信州大院総合医理工，[2]農研機構野菜花き研究部門，[3]信州大農）

3D07-10　間引きした真昆布の有効利用～昆布シートの作成の試み～
亀井 日向子，平田 健人，安齋 潤一郎，○清野 晃之（函館高専）

3D07-11　さつま砂糖漬けにおける発酵期間中の真菌叢と品質変化
○福田 翼，小林 聡子，辰野 竜平，古下 学（水大校・食品科学）

3D07-12　ニラの鮮度評価
○安齋 潤一郎，清野 晃之（函館高専）

3D07-13　シクロデキストリン包接によるオルトジヒドロキシイソフラボンの溶解性向上
○上梶 友記子[1]，中田 大介[1]，平松 直人[2]，寺尾 啓二[1]（[1]シクロケムバイオ，[2]東洋発酵）

ミーティングルームE 質疑応答コアタイム 9:00～9:30

食品―食品機能・栄養 - 免疫，炎症 / 食品機能・栄養 - 酸化，抗酸化，糖化，抗糖化，老化 / 食品機能・栄養 - メタボリック・シンドローム，エネルギー代謝―

3E01-01　乳酸菌 *Leuconostoc mesenteroides* NTM048 の摂取はマウスの乾癬症状を軽減する
○小川 知紗[1]，井上 亮[2]，久 景子[3]，米島 靖記[3]，山本 祥也[1]，鈴木 卓弥[1]（[1]広島大院・統合生命，[2]摂南大・農，[3]Noster株式会社）

3E01-02　クレソンに含まれるウレア化合物の摂取がマウス血中エイコサノイドに与える影響
○中屋 慎[1,2,3]，中上 拓海[3]，濱野 未宇[1]，藤原 永年[4]，庄條 愛子[5]，北村 進一[2]（[1]大手前栄養学院専門学校，[2]大阪府立大学，[3]大手前大学，[4]帝塚山大学，[5]相愛大学）

3E01-03　レスベラトロールおよびその類縁化合物の抗アレルギー効果
○村上 裕紀[1]，水﨑 愛[2]，西 甲介[2]，石田 萌子[2]，菅原 卓也[2]（[1]愛媛大・農，[2]愛媛大院・農）

3E01-04　*Lactobacillus paracasei* K71 の経口投与による IgA 産生促進と NK 活性増強効果
○山本 佳奈[1]，吉澤 梓織[2]，畑 実里[2]，三原 敏敬[1]，杉本 淑惠[1]，内山 公子[1]，城 斗志夫[2]，原 崇[2]（[1]亀田製菓，[2]新潟大農）

3E01-05　活性化マクロファージにおけるケルセチン抱合代謝物の機能性
○西川 美宇，加田 ゆり子，木全 未来，松村 美咲，榊 利之，生城 真一（富山県大工）

3E01-06　味噌の摂取は免疫ロバストネスを高める
○小竹 久仁彦[1,2]，熊澤 利彦[1,2]，安達 貴弘[2]（[1]イチビキ株式会社，[2]東京医科歯科大・難研・免疫）

3E01-07　ルテオリンによる肝臓での薬物代謝第２相酵素発現誘導に投与タイミングが及ぼす影響について
○石野 正晃，北風 智也，牧山 敦志，芦田 均（神戸大農）

3E01-08　アルツハイマー病初期における脳中プラズマローゲンおよび関連リン脂質の解析
○野間口 早紀，乙木 百合香，仲川 清隆，加藤 俊治，伊藤 隼哉，高須 蒼生，板谷 麻由子，清水 直紀，宮崎 瑠璃子，中務 絵梨子，山田 皓輝（東北大院農・機能分子解析学）

3E01-09　脂肪摂取による一過性酸化ストレスの検出
○數村 公子[1,2]，竹内 康造[2]，九澤 香織[3]，波多野 薫子[1]，永井 雅[4]，美和 登志幸[5]，服部 将貴[1]，内藤 通孝[3]，大澤 俊彦[6]（[1]浜松ホトニクス・GSCC，[2]浜松ホトニクス・中研，[3]椙山女学園大・生活科学，[4]ヘルスケアシステムズ，[5]浜松ホトニクス・電子管，[6]愛知学院大・心身）

3E01-10　ソバ全層粉の長期摂取が老化促進マウス SAMP8 の学習記憶能力と腸内細菌叢に及ぼす影響
○岡畠 千鶴[1]，萩原 一晃[2]，山崎 慎也[2]，高橋 佑汰[2]，中村 宗一郎[1]，片山 茂[1,3]（[1]信州大院・農，[2]長野県工技センター，[3]信州大・バイオメディカル研）

3E01-11　ビタミン C 誘導体はコラーゲンの糖化に影響を与える
○望月 萌恵[1]，野村 義宏[1]，松本 大志[2]，太田 涼介[2]（[1]東京農工大学，[2]新日本製薬株式会社）

3E01-12　市販米味噌の抗糖化活性
○瀬戸山 央，橋本 知子（地方独立行政法人神奈川県立産業技術総合研究所）

3E01-13　宿主由来の 12 α水酸化胆汁酸は新規脂肪酸合成の亢進を介して脂肪肝を誘導する
○堀 将太，石塚 敏（北大農）

3E01-14　異なる脂質由来高脂肪食に対するマウスの選択性と過体重に与える影響
○松坂 祐希，松山 弘希，田中 航，榊原 啓之（宮崎大農）

3E01-15　転写因子 ATF4 を介して FGF21 の発現を亢進する新規食品成分の探索・解析
○菱田 遼太郎，清水 誠，藤木 航平，山内 祥生，佐藤 隆一郎（東京大学）

ミーティングルーム E 質疑応答コアタイム 10:00～10:30

食品―食品機能・栄養 - ビタミン・ミネラル / 食品機能・栄養 - 酸化，抗酸化，糖化，抗糖化，老化 / 食品機能・栄養 - その他―

3E03-01　ヒト型 PXR マウスにおけるビタミン K の胆汁酸代謝関連遺伝子発現への影響
○錦戸 迪哉，Sultana Halima，渡邉 きみか，大崎 雄介，駒井 三千夫，白川 仁（東北大・院農・栄養学）

3E03-02　ビタミン B_{12} 欠乏が線虫（*C. elegans*）のジチロシン含量に及ぼす影響
○美藤 友博[1,2]，岡本 奈穂[2]，山本 葵[1]，藪田 行哲[1,2]，渡邉 文雄[1,2]（[1]鳥取大農，[2]鳥取大院連農）

3E03-03　ヒト苦味受容体の遺伝子多型と唾液中亜鉛関連因子の解析
○川又 美南，長谷川 雄大，鈴木 綾，大崎 雄介，駒井 三千夫，白川 仁（東北大院・農）

3E03-04　ビタミン D は 11 β -HSD1 の発現誘導を介して脂肪細胞の分化を制御する
○中嶋 桃菜，三谷 塁一（信州大学）

3E03-05　ラットにおけるビタミン A 体内濃度の性差
○守谷 浩子[1]，佐藤 遼太[1]，横堀 友希[2]，竹中 麻子[2]（[1]明治大院農，[2]明治大農）

3E03-06　α - トコフェロール輸送タンパク質の進化的起源の探索
○矢竹 真[1]，増澤(尾崎) 依[2]，鈴木 博実[3]，竹中 麻子[3]（[1]明治大院農，[2]日大生資科，[3]明治大農）

3E03-07　*Piper longum* から単離した 4 種のネオリグナンのメラニン産生抑制作用
○島村 真弥[1]，浮谷 基彦[1]，纐纈 守[2]，Lwin Mon Mon Myint[3]，仁科 淳良[1]（[1]日大理工，[2]岐阜大工，[3]FAME）

3E03-08　*Vitex trifolia* 成分の *in vitro* 糖尿病モデル系に対する作用
○茂木 一稀[1]，浮谷 基彦[1]，纐纈 守[2]，Lwin Mon Mon Myint[3]，仁科 淳良[1]（[1]日大理工，[2]岐阜大工，[3]FAME）

3E03-09　*Moringa oleifera* 含有成分の *in vitro* 非アルコール性脂肪性肝疾患(NAFLD)モデル系に対する作用
○桐生 莉沙[1]，浮谷 基彦[1]，纐纈 守[2]，Lwin Mon Mon Myint[3]，薩 秀夫[4]，仁科 淳良[1]（[1]日大理工，[2]岐阜大工，[3]FAME，[4]前工大工）

3E03-10　ホウレンソウとグリーンキウイのフィトール含量およびクロロフィル分解酵素の活性
○横坂 伸一，浅田 ゆり，松田 寛子，奈良井 朝子（日獣医大応生科）

3E03-11　プラセンタエキスの摂取がヒト皮膚のバリア機能に及ぼす効果
○座間 悠次[1]，宮下 忠士[2]，関口 聡[2]，山浦 信明[2]，影山 将克[2]，丹羽 光一[1]（[1]東京農大食品香粧，[2](株)DHC）

3E03-12　アセロラがもたらすヒト腸内細菌叢への影響の *in vitro* 評価試験
○山内 洋輔[1]，森 友花[1]，ハルタント テナギ[1]，萩原 俊彦[2]，内田 絵理子[2]，小泉 雄史[2]，福田 真嗣[1,3,4,5]（[1]株式会社メタジェン，[2]株式会社ニチレイ　技術戦略企画部，[3]慶應義塾大学先端生命科学研究所，[4]神奈川県立産業技術総合研究所，[5]筑波大学医学医療系）

ミーティングルームE 質疑応答コアタイム 11:00～11:30

食品―食品機能・栄養 - メタボリック・シンドローム，エネルギー代謝 / 食品機能・栄養 - 酸化，抗酸化，糖化，抗糖化，老化 / 食品機能・栄養 - その他―

3E05-01　共役リノール酸による低酸素条件下での脂肪細胞の尿酸産生抑制効果
○岩瀬 大夢[1]，小川 健二郎[2]，西山 和夫[1]，山﨑 正夫[1]　([1]宮崎大農，[2]宮崎大TT推進機構)

3E05-02　Beneficial Effects of Teasperin Isolated from Microbial-Fermented Tea on Cultured Adipocytes
○LEE Chin，ANDO Tenrin，YOSHIDA Shigeki，MIYAZAKI Hitoshi　(Tsukuba Univ.)

3E05-03　アミノ酸混合物と運動の併用による褐色脂肪細胞化の誘導とその機構解明
○江崎 菜々，小島 拓也，津田 孝範　(中部大・応生)

3E05-04　白色脂肪組織の glycerol kinase は細胞内脂肪酸代謝調節を介して褐色化を制御する
○後藤 剛[1,2]，岩瀬 麻里[1]，常盤 颯志[1]，瀬尾 茂人[3]，向井 貴子[4]，高橋 春弥[1]，野村 亘[1,2]，Jheng Huei-Fen[1]，松村 成暢[1]，楠堂 達也[4]，大里 直樹[3]，松田 秀雄[3]，井上 和生[1,2]，河田 照雄[1,2]　([1]京大院　農，[2]京大　C-PIER，[3]阪大　情報　，[4]帝塚山学院大人間科学)

3E05-05　魚油の抗肥満作用メカニズムにおける UCP1 の役割について
○中原 蓮[1]，和田 健司[2]，石川 瑛未[2]，川手 啓吾[1]，奥江 紗知子[1]，三浦 徳[3]，増澤(尾崎) 依[2]，細野 崇[1,2]，関 泰一郎[1,2,3]　([1]日大院・生資科・応生科，[2]日大・生資科・生命化，[3]日大・生資科・総合研究所)

3E05-06　アムラエキスが脂質過酸化に及ぼす影響
○小山 泰史，越中 雪乃，森 雄一郎，山元 宏貴　(三基商事株式会社)

3E05-07　ナマコ摂取による皮膚光老化抑制作用の評価
○LIU SHUYU[1]，盧 翌[2]，黒野 昌洋[2]，又平 芳春[2]，真鍋 祐樹[1]，菅原 達也[1]　([1]京大院農・応用生物，[2]三生医薬株式会社)

3E05-08　酸化ストレスおよび肝障害下のヒト肝ガン由来細胞株 HepG2 に対するポリフェノールの効果
○森 淳輝，山田 康枝　(近畿大院)

3E05-09　Lys-Glc メイラード反応生成物が線虫(*C.elegans*)の寿命に及ぼす影響
○横山 壱成[1]，瀬戸山 央[2]，小宮 佑介[1]，長竿 淳[1]，有原 圭三[1]　([1]北里大獣，[2](地独)神奈川県立産技総研)

3E05-10　ケルセチンのプレニル化による抗酸化特性の変化
○吉田 真生[1]，田井 章博[2]，向井 理恵[2]　([1]徳島大・生物，[2]徳島大学院・社会産業理工)

3E05-11　複合プロバイオティクスが腸内環境に与える影響
○山口 大貴[1]，金谷 忠[1]，河野 麻実子[1]，川上 宏智[1]，稲垣 瑞穂[2]　([1]森下仁丹株式会社　ヘルスケア事業本部　ヘルスケア研究開発部，[2]岐阜大・応用生物)

3E05-12　幼若期における咀嚼刺激が記憶に与える影響
○李 善美[1]，安岡 顕人[2]，永井 俊匡[3]，斎藤 芳和[1]，阿部 啓子[1,4]，朝倉 富子[1]　([1]東大院農生科，[2]聖徳大・人間栄養，[3]高崎健大・健康栄養，[4]神奈川県立産業技術総合研究所)

3E05-13　長期間の咀嚼は視床下部の遺伝子発現の変化と血圧の低下をもたらす
○永井 俊匡[1]，齊藤 美佳[2]，清水 愛恵[1]，齋藤 芳和[3]，安岡 顕人[4]，阿部 啓子[3,5]，朝倉 富子[3]　([1]高崎健大・健康栄養，[2]東洋大・健康栄養，[3]東大院農生科，[4]聖徳大・人間栄養，[5]神奈川県立産業技術総合研究所)

3E05-14　植物フィトケミカル及びその代謝物によるコロナウイルス 3CL プロテアーゼ阻害
○加藤 陽二[1,2]，焼本 千里[1]，伊藤 美紀子[1,2]，辻 一徳[3]，丹羽 利夫[4]，西川 美宇[5]，生城 真一[5]　([1]兵庫県大環境人間，[2]兵庫県大先端食セ，[3]分子機能研究所，[4]修文大健康栄養，[5]富山県大工)

3E05-15　乳酸菌を用いた新規微生物制御発酵茶の製造
○永嶺 海夕，椎葉 究，安部 智子　(電機大理工)

ミーティングルームE 質疑応答コアタイム 13:00～13:30

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

3E06-01　環状四糖(CNN)水あめの消化性および整腸作用
○内田 智子，安田 亜希子，溝手 晶子，谷口 美文，尾平 優，高橋 遼，吉實 知代，石橋 真紀，森下 尚紀，遠藤 伸，三皷 仁志，山本 晃隆　(株式会社 林原)

3E06-02　環状四糖(CNN)水あめのエネルギー評価とヒト腸内発酵性
○溝手 晶子，安田 亜希子，石田 有希，吉實 知代，角田 省二，遠藤 伸，三皷 仁志，山本 晃隆　(株式会社 林原)

3E06-03　環状四糖(CNN)の 摂取が高脂肪食誘導性肥満マウスのインスリン抵抗性に及ぼす影響
○鶴田 剛司[1]，溝手 晶子[3]，塩津 萌々子[2]，佐相 晴香[2]，西野 直樹[1]　([1]岡山大院環境生命，[2]岡山大農，[3]株式会社 林原)

3E06-04　エクストラバージンオリーブオイルの香りをもたらす揮発性物質の起源の解明
○境野 眞善[1,2]，加藤 俊治[2,3]，伊藤 隼哉[2]，竹内 茂雄[1]，今義 潤[1,3]，仲川 清隆[2,3]　([1](株)J-オイルミルズ，[2]東北大院農・機能分子解析学，[3]東北大院農・J-オイルミルズ油脂イノベーション共同研究講座)

3E06-05　プラズマローゲンの化学合成と LC-MS/MS 定量分析への活用
○前田 鋭[1]，乙木 百合香[1]，小倉 由資[2,3]，桑原 重文[3]，仲川 清隆[1]　([1]東北大院農・機能分子解析学，[2]東大院農・有機化学，[3]東北大院農・生物有機化学)

3E06-06　イチジク由来セリンプロテアーゼの精製と性状解析
○上島 直生[1]，西村 耕作[1,2]，東矢 圭右[1]，兒島 憲二[1]，滝田 禎亮[1]，阿部 竜也[2]，高橋 徹[2]，保川 清[1]　([1]京大院・農，[2](公財)東洋食品研究所)

3E06-07　酵素剤プロテアックスからのアミノペプチダーゼの精製と特性，及びアミノペプチダーゼによるタンパク質加水分解物の苦味除去
○中村 梨乃，田口 楓，齋藤 愛未，廣田 圭佑，丸山 美香，林 清　(東洋大学)

3E06-08　DMT-(S)-Pro-OSu 誘導体化によるジペプチドー斉分析法の開発と発酵カカオ豆の成分プロファイリング
○寺田 祐子[1]，中山 綾花[1]，久田 拓海[2]，藤谷 将也[2]，福井 芹菜[1]，蟹江 慧[2]，加藤 竜司[2]，繁田 尭[1]，杉山 栄二[1]，水野 初[1]，轟木 堅一郎[1]，伊藤 圭祐[1]　([1]静県大院・薬食，[2]名大院・創薬)

3E06-09　ファージディスプレイ法によるポリフェノール修飾タンパク質結合ペプチドの探索
○山本 広史，佐々木 栄太，板倉 正典，内田 浩二　(東大院農生科)

3E06-10　アスパラギン酸トランスアミナーゼを利用したアスパラギン酸測定キットの開発
○西山 辰也[1,2]，ウォロ　トリアルシ スリスティアニンディア[1]，新舘 啓子[1]，上田 賢志[2]，日下部 均[1]　([1]株式会社エンザイム・センサ，[2]日大生資科)

3E06-11　赤小豆中のカテキノピラノシアニジン A,B の定量分析
○高山 陽子，数馬 恒平，吉田 久美　(名大院情)

3E06-12　かつお節香気の呈味増強成分探索手法としての，新規評価技術テイスティング -GC™ の活用
○菅 一也，朝比奈 尚紀，葛西 賢造，木村 公子　(曽田香料株式会社)

3E06-13　レモングラス精油の香気劣化抑制に対するα - トコフェロールと各種抗酸化物の相乗効果の解析
○太田 香穂[1,2]，宮崎 真緒[1]，立山 優香[1]，小林 弘司[1]，石川 洋哉[1]　([1]福岡女子大院，[2]株式会社　クマモト敬和)

3E06-14　アスタキサンチン製剤が加熱ソーセージの脂質酸化に与える影響
○渡嘉敷 柚，三上 奈々，島田 謙一郎　(帯畜大院)

3E06-15　ビール中の黄色低分子色素化合物の単離と同定
○桐原 明里，野田 響子，村田 容常 （お茶の水女子大学）

3E06-16　特徴的な香気成分を同定するアロマデザイナーの開発
○宮崎 雅雄[1]，喜多 純一[2] （[1]岩手大学，[2]島津製作所）

3E06-17　アルギン酸加熱物中のポリフェノールの同定とその抗酸化的性質
○土居 采矢佳，増田 俊哉 （大阪市大院生活）

3E06-18　ツタンカーメンエンドウに含まれる抗酸化成分の探索および同定
○前川 優樹[1]，近藤(比江森) 美樹[1,2] （[1]徳島文理大院人間生活，[2]徳島文理大人間生活）

3E06-19　日本の伝統的後発酵茶，碁石茶の特徴的な味の解明
○阪地 満帆，大塚 祐季，柏木 丈拡，島村 智子，受田 浩之 （高知大学）

ミーティングルームF 質疑応答コアタイム 9:30～10:00

有機化学，天然物化学―天然物 - 単離構造決定 - 微生物 / 天然物 - 生合成 / 合成，反応機構―

3F02-01　子嚢菌 *Podostroma giganteum* からの新規生物活性物質の探索
○長谷川 美紀子[1]，細矢 剛[2]，小林 啓介[3]，供田 洋[3]，繁森 英幸[4,5] （[1]筑波大院生命環境，[2]国立科博植物研，[3]北里大薬，[4]筑波大生命環境，[5]筑波大MiCS）

3F02-02　放線菌 TU14386 株が生産する植物病原菌形態異常誘導物質に関する研究
○畑江 拓斗，大塚 みゆき，堀 浩 （玉川大院農）

3F02-03　ヘム重合阻害を指標とした微生物代謝産物からの抗マラリア活性物質の探索
○清水 優希[1]，石山 亜紀[1,2]，小池 李茉[1]，渡邊 善洋[2]，穂苅 玲[2]，肥後 茉由佳[2]，常盤 俊之[2]，稲橋 佑起[1,2]，野中 健一[1,2]，岩月 正人[1,2] （[1]北里大学感染制御科学府，[2]北里大大村研）

3F02-04　微生物代謝産物からのマラリア原虫増殖阻害活性物質の探索
○渡邊 善洋[1]，蜂谷 広大[2]，池田 朱里[1,3]，穂苅 玲[1]，石山 亜紀[1,3]，野口 千夏子[1]，村松 玲子[1]，戸澤 美帆[1]，肥後 茉由佳[1]，野中 健一[1,3]，照屋 俊明[4]，石井 貴広[5]，廣瀬 友靖[1,3]，砂塚 敏明[1,3]，岩月 正人[1,3] （[1]北里大院感染制御，[2]北里大 理学部生物科学科，[3]北里大大村研，[4]琉球大教育学部，[5]琉球大農学部）

3F02-05　病原真菌 *Aspergillus* 属と免疫細胞の共培養法を用いた休眠遺伝子活性化による新規天然物の探索
○氏江 優希子[1]，齋藤 駿[1]，矢口 貴志[2]，荒井 緑[1] （[1]慶大理工，[2]千葉大真菌センター）

3F02-06　耐熱性放線菌 JA74 株が生産する熱ショック代謝物(HSM)に関する研究
○船山 佳世[1]，齋藤 駿[1]，加藤 航[1]，新藤 一敏[2]，井本 正哉[3]，荒井 緑[1] （[1]慶大理工，[2]日本女子大家政，[3]順天堂大院医）

3F02-07　*In vitro* 解析と X 線結晶構造解析による 2 種の II 型 PKS と FAS における ACP-KS 間特異性制御機構の解明
○堀内 真展[1]，杜 丹ヤオ[1]，DAVIS Tony D.[2]，BURKART Michael D.[2]，勝山 陽平[1,3]，大西 康夫[1,3] （[1]東大院・農生科・応生工，[2]University of California, San Diego，[3]東大・微生物イノベ連携機構）

3F02-08　放線菌二次代謝における亜硝酸を用いた芳香環アミノ基導入機構の解析
勝山 陽平[1,2]，○桑原 康[3]，大西 康夫[1,2] （[1]東大院・農生科・応生工，[2]東大・微生物イノベ連携機構，[3]東大農・生命化学工学）

3F02-09　ヒドラジドを有するアリールポリエン spinamycin の生合成研究
○川合 誠司[1]，山田 研人[1]，勝山 陽平[1,2]，大西 康夫[1,2] （[1]東大院・農生科・応生工，[2]東大・微生物イノベ連携機構）

3F02-10　渦鞭毛藻サキシトキシン生合成酵素 SxtA の細胞内局在の解明と *sxtA* 遺伝子解析による無毒化機構の提唱
○長 由扶子[1]，日出間 志寿[2]，大村 卓朗[3]，小池 一彦[4]，小池 香苗[5]，及川 寛[6]，此木 敬一[1]，大島 泰克[7]，山下 まり[1] （[1]東北大院農，[2]福島医大，[3]水圏科学，[4]広大院統合生命，[5]広大NBARD，[6]水産機構水産技術研，[7]東北大院生命）

3F02-11　麻痺性貝毒サキシトキシンの推定生合成中間体の合成と有毒渦鞭毛藻中における同定
○東海林 千容[1]，長 由扶子[1]，安達 栞菜[2]，石塚 颯[2]，此木 敬一[1]，及川 寛[3]，小池 一彦[4]，長澤 和夫[2]，山下 まり[1] （[1]東北大院農，[2]東農工大院工，[3]水産機構水産技術研，[4]広大院統合生命）

3F02-12　ステロイド系天然物 Physalin 類の合成研究
○新木 悠介，中崎 敦夫，西川 俊夫 （名大院生命農）

3F02-13　ノルトリテルペノイドの A 環部分の構築
○多湖 光佑，西川 俊夫，中崎 敦夫 （名大院生命農）

3F02-14　バラの重要香気成分である DAMASCENOLIDE の類縁体合成と香気特性（第 2 報）
○宮澤 和[1,2]，川口 賢二[1]，勝田 亮[2]，額田 恭郎[2]，石神 健[2] （[1]長谷川香料（株），[2]東農大・生命）

3F02-15　炭素環構造を持つユニークな糖 Bradyrhizose の合成研究
○伊東 祐太朗，今野 寛之，松島 芳隆 （東京農業大学・農芸化学化）

3F02-16　Schiff 塩基型キラル Ni 錯体を用いた光学活性アミノ酸類の合成研究
○今野 博行[1]，茂野 優平[1]，中野 有那[1]，長岡 敬太[1]，Jianlin Han[2]，森脇 浩樹[3]，Vadim Soloshonok[4] （[1]山形大院理工，[2]南京森林大，[3]浜理薬品，[4]バスク大）

ミーティングルームF 質疑応答コアタイム 10:30～11:00

有機化学，天然物化学―天然物 - 生合成 / 天然物 - 作用機構 / 天然物 - ケミカルバイオロジー / 合成，反応機構―

3F04-01　麹菌異種発現を用いた PR-toxin の生合成研究 -2-
○佐藤 芳郎，瀧野 純矢，尾﨑 太郎，劉 成偉，南 篤志，及川 英秋 （北大院理）

3F04-02　担子菌由来抗腫瘍物質 melleolide の全生合成
○尾関 美衣菜[1]，長嶺 翔太[1]，尾﨑 太郎[1]，河岸 洋和[2]，丸山 潤一[3]，南 篤志[1]，及川 英秋[1] （[1]北大院理，[2]静大グリーン研，[3]東大院農生科）

3F04-03　特徴的な繰り返し構造を持つ phialotide の生合成研究（1）
○瀧野 純矢，小谷 明里，尾﨑 太郎，南 篤志，及川 英秋 （北大院理）

3F04-04　カンキツ brown spot 病菌由来宿主特異的毒素 ACR-toxin の生合成
○小谷 明里[1]，瀧野 純矢[1]，尾﨑 太郎[1]，望月 進[2]，秋光 和也[2]，南 篤志[1]，及川 英秋[1] （[1]北大院理，[2]香川大農）

3F04-05　昆虫ニコチン性アセチルコリン受容体の再構築とネオニコチノイドの活性
○伊原 誠[1]，小森 勇磨[1]，神谷 昌輝[1]，小泉 航[1]，吉成 祐人[2]，丹羽 隆介[2]，SATTELLE David B.[3]，松田 一彦[1] （[1]近畿大農，[2]筑波大，[3]UCL）

3F04-06　スピロコハク酸イミド構造をもつ殺線虫活性物質の標的サブタイプ選択性のメカニズム
○小泉 航，伊原 誠，松田 一彦 （近畿大農）

3F04-07　コムネシン類の標的活性化作用の構造活性相関
○矢野 雄大[1]，伊原 誠[1]，甲斐 建次[2]，林 英雄[2]，松田 一彦[1] （[1]近畿大農，[2]大阪府大）

3F04-08　ホスホン酸エステル型ピレスリン生合成酵素阻害剤の構造活性相関
○杉坂 如水[1]，小椋 明生[1]，伊原 誠[1]，松尾 憲忠[2]，田辺 陽[2]，松田 一彦[1] （[1]近畿大農，[2]関西学院大理工）

3F04-09　不可逆的阻害剤への応用に向けた 3,4-dihydroquinolizinium 化合物の開発
○川合 計太朗[1]，小鹿 一[1]，中川 優[1,2]　([1]名大院・生命農，[2]iGCORE)

3F04-10　アミド化したプラディミシン誘導体の凝集性とマンノース結合活性
○大矢 柚香[1]，小鹿 一[1]，五十嵐 康弘[2]，伊藤 幸成[3,4]，中川 優[1,3,5]　([1]名大院・生命農，[2]富山県大・生工，[3]理研，[4]阪大院・理，[5]iGCORE)

3F04-11　(+)-cannogenol の全合成
○渡邉 正悟，西川 俊夫，中崎 敦夫　(名大院生命農)

3F04-12　19-nordigitoxigenin の全合成
○松村 泰志，西川 俊夫，中崎 敦夫　(名大院生命農)

3F04-13　マオエクリスタルVの合成研究
○片山 峻樹，浦 達哉，井田 浩介，佐藤 勇気，泉 実，清田 洋正　(岡大院・環境生命)

3F04-14　パルミトイル化されたヒストン H4 の化学合成および機能解析
○中谷 文香[1]，末武 勲[2]，北條 裕信[1]　([1]大阪大学，[2]中村学園大学)

3F04-15　2,6-2 置換ピペリジン環の立体選択的な構築法の開発と (+)-solenopsin の合成
○真壁 秀文[1]，鈴木 香名[2]，河村 篤[1]，服部 恭尚[3]　([1]信州大バイオメディカル研，[2]信州大院総合理工，[3]京都薬大機器分析セ)

3F04-16　ヒト培養細胞を宿主とした抗生物質の生産
○松田 真弥[1]，恒松 雄太[1]，尾形 勇二[1]，蜂矢 志保実[1]，岸本 真治[1]，三好 規之[2]，渡辺 賢二[1]　([1]静岡県大薬，[2]静岡県大院食品栄養環境科学)

ミーティングルームF 質疑応答コアタイム 13:30～14:00

有機化学，天然物化学―天然物 - 生合成 / 天然物 - 代謝 / その他―

3F07-01　黒ダイズ種皮アントシアニンの新しい生合成経路
○吉田 久美[1]，テッパブット ヤダー[1]，澤口 怜央[1]，尾山 公一[2]，西崎 雄三[3]，合田 幸広[3]，近藤 忠雄[1]　([1]名大院情報，[2]名大物国セ，[3]国立衛研)

3F07-02　オオケビラゴケ由来ビベンジルカンナビノイドの生合成研究
○田浦 太志[1]，高橋 宏暢[2]，兼目 裕充[2]，浅川 義範[2]，保野 陽子[3]，品田 哲郎[3]　([1]富山大薬，[2]徳島文理大薬，[3]大阪市立大理)

3F07-03　シロイヌナズナにおけるフェアリー化合物の生合成に関連した新規プリン代謝の解明
○竹村 太秀[1,2]，谷口 有希[3]，崔 宰熏[1,3,4]，平井 浩文[1,3,4]，菅 敏幸[5]，本橋 令子[1,3,4]，河岸 洋和[1,3,4]　([1]静岡大院創造，[2]JSPS，[3]静岡大院総合農，[4]静岡大グリーン研，[5]静岡県大薬)

3F07-04　コムラサキシメジにおける 2-azahypoxanthine に特異なトリアジン基の形成機構に関する研究
○鈴木 兵梧[1]，伊藤 彰将[2,3]，古田島 美颯[2]，崔 宰熏[1,2,4]，鈴木 智大[5]，平井 浩文[1,2,4]，浅川 倫宏[6]，大内 仁志[7]，稲井 誠[7]，菅 敏幸[7]，道羅 英夫[4]，河岸 洋和[1,2,4]　([1]静大農・応生化，[2]静大院・創造，[3]JSPS，[4]静大・グリーン研，[5]宇都宮大・バイオ，[6]東海大・海洋，[7]静県大・薬)

3F07-05　ICA の代謝産物である S-ICAr-H の存在意義についての研究
○古田島 美颯[1]，崔 宰熏[1,2,4]，呉 静[2]，謝 肖男[3]，木村 洋子[4]，道羅 英夫[2]，大西 利幸[1,2,4]，平井 浩文[1,2,4]，浅川 倫宏[5]，大内 仁志[6]，稲井 誠[6]，菅 敏幸[6]，河岸 洋和[1,2,4]　([1]静大院・創造，[2]静大・グリーン研，[3]宇都宮大・バイオ，[4]静大院・総合農，[5]東海大・海洋，[6]静県大・薬)

3F07-06　日本産ヒキガエルが有する耳腺毒成分，bufadienolide の多様性
○井上 貴斗[1]，中田 隆[1,2]，サヴィツキイ アラン[3]，吉永 直子[1]，森 哲[4]，森 直樹[1]　([1]京大院農，[2]京都先端科学大バイオサイエンス，[3]ユタ州立大生物，[4]京大院理)

3F07-07　イネがもつ (*R*)-*β*-tyrosine 量の時間的変動
○阪本 駿太，吉川 貴徳，寺石 政義，吉永 直子，小野 肇，森 直樹　(京都大農)

3F07-08　リンゴ果実の酵素・基質両誘導型の食害応答性防御機構の解明
○大畑 勇統[1]，吉永 直子[1]，石栗 陽一[2]，森 直樹[1]　([1]京都大院・農，[2]青森産技セ　りんご研)

3F07-09　モモシンクイガに対するサポナイトの産卵抑制機構の解明
○室賀 邦太朗[1]，風間 春奈[1]，石栗 陽一[2]，江口 美陽[3]，加島 幸二[4]，黒坂 恵一[4]，吉永 直子[1]，森 直樹[1]　([1]京大院農，[2]青森産技セ　りんご研，[3]物材機構，[4]クニミネ工業株式会社)

3F07-10　超臨界流体クロマトグラフィーと結晶スポンジ法を連結した分析系による微量香気成分の一斉構造解析
○北田 直也，三輪 真由佳，谷口 慈将　(キリンHDキリン中央研)

3F07-11　超臨界流体クロマトグラフィーと結晶スポンジ法を連結した分析系における極性溶媒耐性結晶スポンジの活用
○三輪 真由佳，北田 直也，谷口 慈将　(キリンHD キリン中央研)

3F07-12　求核性化合物の解析を可能とする拡張結晶スポンジ法の開発
○谷口 慈将，松本 理恵，門田 智之　(キリンHDキリン中央研)

3F07-13　頭皮常在菌の制御を目的とした天然成分の探索
○門脇 航[1]，本田 沙理[1]，渡邉 紘介[2]，伊藤 廉[2]，熊澤 茂則[1]　([1]静岡県大院薬食，[2]ミルボン株式会社)

3F07-14　サソリ表皮由来の蛍光物質：CDPE の構造と蛍光特性の関係
○義本 裕介，宮下 正弘，中川 好秋，宮川 恒　(京大農)

3F07-15　ホタル生物発光を利用した新規近赤外発光材料の開発
○神谷 弦汰[1]，北田 昇雄[1]，齊藤 亮平[2]，岩野 智[3]，宮脇 敦史[3]，平野 誉[1]，牧 昌次郎[1]　([1]電気通信大学，[2]東京薬科大学，[3]理化学研究所)

3F07-16　ホタルルシフェリンの新規波長制御技術
○土肥 広和[1]，神谷 弦汰[1]，北田 昇雄[1,4]，斎藤 亮平[2]，岩野 智[3]，平野 誉[1]，牧 昌次郎[1,4]　([1]電通大情報理工，[2]東薬大薬，[3]理研，[4]電通大院脳医工)

ミーティングルームG 質疑応答コアタイム 9:00～9:30

有機化学，天然物化学―天然物 - 生合成 / 天然物 - ケミカルバイオロジー / 合成，反応機構―

3G01-01　ヒト薬物代謝遺伝子を用いた糸状菌二次代謝物の多様性拡大法の確立とプロドラッグ型化合物の探索
○岡本 拓実，岸本 真治，渡辺 賢二　(静岡県大薬)

3G01-02　高等菌類の子実体形成促進物質 chaxine B の生合成研究
○難波 良太[1]，岸本 真治[1]，呉 静[2]，西川 俊夫[3]，守屋 央朗[4]，及川 英秋[5]，河岸 洋和[2]，渡辺 賢二[1]　([1]静岡県大薬，[2]静大グリーン研，[3]名大院生命農，[4]岡山大異分野融合研究コア，[5]北大院理)

3G01-03　糸状菌由来天然物 fumimycin の特異な骨格に関する生合成研究
○南 歩実，岸本 真治，渡辺 賢二　(静岡県大薬)

3G01-04　糸状菌 *Aspergillus lentulus* 由来新規化合物 lentopeptin 類の単離・構造決定および生合成解析
○松原 有也，岸本 真治，渡辺 賢二　(静岡県大薬)

3G01-05　共生型子嚢菌 Pyrenula sp. に由来する pyrenulic acid 類の生合成研究
○伊藤 優衣[1]，佐藤 道大[1]，籠浦 倫美[1]，恒松 雄太[1]，竹仲 由希子[2]，棚橋 孝雄[2]，渡辺 賢二[1]　([1]静岡県立大薬，[2]神戸薬科大)

3G01-06　フェノール酸とブルーライトを併用した真菌の光不活性化
○川阪 凱士，土屋 浩一郎，長宗 秀明，白井 昭博　(徳島大学)

3G01-07　Hitachimycin による出芽酵母細胞内 pH ホメオスタシス障害
○岩井 南会子[1]，南雲 陽子[2]，髙橋 壯太朗[3]，工藤 史貴[3]，江口 正[3]，臼井 健郎[2]　([1]筑波大学・生物学類，[2]筑波大学・生命環境，[3]東京工業大学・理学院化学系)

3G01-08　非共有結合性 TRPA1 アゴニストによるタイトジャンクション開口活性検討
○向山 海凪[1]，南雲 陽子[2]，臼井 健郎[2]　([1]筑波大学大学院・生命環境科学研究科，[2]筑波大学・生命環境系)

3G01-09　酵母ユビキチンリガーゼ *rsp5*^{A401E} 株の AZC ストレス下で生育回復活性を有する化合物の探索と評価
○松浦 秀太郎[1]，高木 博史[2]，木村 賢一[1]　([1]岩手大院・総合科学，[2]奈良先端大・バイオサイエンス)

3G01-10　ドイツ産琥珀と久慈産琥珀の生物活性物質の構造と活性の比較研究
○鈴木 瑞季[1]，井上 奈々[2]，田中 来実[1]，CESAR Menor-Salvan[3]，越野 広雪[4]，木村 賢一[1]　([1]岩手大・農，[2]岩手大院・総合科学，[3]University of Alcala，[4]理研・CSRS)

3G01-11　Chemical induction of fungal secondary metabolism toward production of novel bioactive secondary metabolites
○Abdelhakim Amin Islam Adel[1,2,3]，Motoyama Takayuki[1]，Futamura Yushi[1]，Osada Hiroyuki[1]　([1]Chemical biology, RIKEN CSRS，[2]Saitama Univ.，[3]Assiut Univ.)

3G01-12　ナキテルピオシン側鎖部の合成研究
○堀江 智也[1]，深谷 圭介[1,2]，占部 大介[1,2]　([1]富山県大工，[2]富県大生医工研セ)

3G01-13　非対称アミド化を用いたデオキシナイボマイシンの合成
○甲斐 瑛歩[1]，深谷 圭介[1,2]，濱田 昌弘[1,2]，馬場 理[3]，占部 大介[1,2]　([1]富山県大工，[2]富県大生医工研セ，[3]順天堂大医)

3G01-14　ベラトリジンの合成研究
○塩野 啓太[1]，深谷 圭介[1,2]，占部 大介[1,2]　([1]富山県大工，[2]富県大生医工研セ)

3G01-15　(-)-Sporothriolide の全合成
○木村 光来，毛利 朋世，佐藤 俊太郎，桑原 重文　(東北大院農)

3G01-16　Quorumsensing 阻害物質 aculene D の全合成
○横川 陽向[1]，石澤 誠也[2]，齋藤 克哉[1]，桑原 重文[1]，榎本 賢[1]　([1]東北大学院農，[2]東北大学農)

ミーティングルーム G 質疑応答コアタイム 10:00～10:30

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

3G03-01　奇数鎖脂肪酸は分裂酵母において細胞膜極性と細胞分裂に異常を引き起こす
○星川 陽次郎[1]，西村 慎一[1,2]，松山 晃久[1,3]，Li Sheena[4]，八代田 陽子[3,4]，Boone Charles[4]，吉田 稔[1,2,3,5]　([1]東大院農・応生工，[2]東大・微生物連携機構，[3]理研CSRS・ケミカルゲノミクス，[4]理研CSRS・分子リガンド標的，[5]理研CSRS・創薬シード)

3G03-02　蛍光共鳴エネルギー移動（FRET）を用いたアミロイドβタンパクのプロトフィブリル形成の検出
○杉山 恵里，稲垣 穣，増田 裕一　(三重大生物資源)

3G03-03　マクロリド環を有する tricothecene 類の構造活性相関研究
○岡村 毅，前多 隼人，森田 英嗣，石田 幸太郎，橋本 勝　(弘前大農)

3G03-04　光屈性制御物質を用いたダイコン光屈性メカニズムの生物有機化学的研究
○野口 美輝[1]，渡邉 諒子[1]，渡邉 秀典[2]，山田 小須弥[3]，繁森 英幸[3,4]　([1]筑波大院生命環境，[2]東京大院農学生命，[3]筑波大生命環境系，[4]筑波大MiCS)

3G03-05　フキ属山菜の化学系統分類規定成分 bakkenolide 類による interleukin-2 産生阻害作用
○上杉 祥太[1]，箱崎 真友佳[1]，菅野 裕子[1]，高橋 穂乃香[2]，工藤 唯[2]，木村 賢一[2]，山田 秀俊[3]，矢野 明[1]　([1]岩手生工研，[2]岩手大院・総合科学，[3]帝京科学大・生命環境)

3G03-06　人工キノン類を用いた複合体 -I のキノン結合ポケットの構造特性の解明
○宇野 晋平[1]，桝谷 貴洋[1]，伊藤(新澤) 恭子[2]，志波 智生[3]，稲岡 健ダニエル[4]，村井 正俊[1]，三芳 秀人[1]　([1]京大農，[2]兵庫県立大生命理学，[3]京都工芸繊維大工芸科学，[4]長崎大熱帯医学)

3G03-07　呼吸鎖複合体 -I ユビキノン結合部位の構造解明に向けたサブユニット間クロスリンク
○桝谷 貴洋，宇野 晋平，村井 正俊，三芳 秀人　(京大院農)

3G03-08　コレラ菌 Na^+ 輸送型 NADH- キノン酸化還元酵素の NqrB サブユニットの位置特異的化学修飾
○石川 萌[1]，田中 比奈子[1]，桝谷 貴洋[1]，バルケラ ブランカ[2]，村井 正俊[1]，三芳 秀人[1]　([1]京都大農，[2]レンセラー工科大)

3G03-09　抗がん剤候補化合物 IACS-010759 の呼吸鎖複合体 -I に対する作用機構研究
○村井 正俊，辻 諄人，赤尾 拓海，桝谷 貴洋，三芳 秀人　(京大院農・応用生命)

3G03-10　出芽酵母ミトコンドリアを標的とする天然テトラミン酸誘導体 Fusaramin の作用機構研究
○運天 優歩[1]，村井 正俊[1]，坂井 克行[2]，浅見 行弘[2]，桝谷 貴洋[1]，三芳 秀人[1]　([1]京大院農，[2]北里大学)

3G03-11　ミトコンドリア呼吸鎖複合体 -I を阻害する Manassantin の作用機構研究
○永岡 千草，村井 正俊，桝谷 貴洋，三芳 秀人　(京大農)

3G03-12　Amphirionin-5 の C17-C28 ユニットの合成研究
○安倍 大裕[1]，小倉 由資[2]，藤田 忠文[2]，桑原 重文[1]　([1]東北大院農，[2]東大院農)

3G03-13　6-Hydroxyterrefuranone の全合成と立体化学の解明
○岡 悠介，髙橋 和暉，桑原 重文，榎本 賢　(東北大院農)

3G03-14　アルキベマイシン A の合成研究
○印藤 寛二[1]，占部 大介[1,2]，深谷 圭介[1,2]　([1]富山県大工，[2]富県大生医工研セ)

3G03-15　17- ヒドロキシドコサヘキサエン酸の合成研究
○岩井 柚樹[1]，深谷 圭介[1,2]，占部 大介[1,2]　([1]富山県大院工，[2]富県大生医工研セ)

3G03-16　ホルモサリド A の合成研究
○茂住 梨紗[1]，駒津 友美[1]，深谷 圭介[1,2]，占部 占部[1,2]　([1]富山県大工，[2]富県大生医工研セ)

ミーティングルーム G 質疑応答コアタイム 11:00～11:30

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

3G05-01　合成サキシトキシン誘導体に対する電位依存性ナトリウムチャネルの感受性評価
○千葉 修[1]，山田 智士[1]，角替 俊輔[1]，島田 紀子[1]，長 由扶子[1]，高柳 優夏[2]，星 美波[2]，安達 栞菜[2]，石塚 颯[2]，長澤 和夫[2]，山下 まり[1]，此木 敬一[1]　([1]東北大農，[2]東京農工大工)

3G05-02　電位依存性ナトリウムチャネルを阻害するクロイソカイメン抽出物の探索
○島田 紀子，千葉 修，角替 俊輔，長 由扶子，山下 まり，此木 敬一　(東北大農)

3G05-03　活性窒素種による細胞傷害から細胞を保護する化合物の作用機構解析および抗炎症作用の検討
○鶴川 幸音[1]，菅野 和紀[1]，鈴木 優華[1]，村上 裕信[1]，竹田 志郎[1]，永根 大幹[1]，坂上 元栄[1]，曽川 一幸[1]，篠田 陽[2]，紙透 伸治[1]　([1]麻布大獣医，[2]東薬大薬)

3G05-04　新規肝臓 X 受容体アンタゴニストの探索とその抗 C 型肝炎ウイルス活性
○齋藤 史季[1]，太田垣 潤一郎[1]，大橋 啓史[2]，西岡 華実[2]，中村 洸[1]，鶴川 幸音[1]，柴崎 久宣[1]，菅野 和紀[1]，村上 裕信[1]，永根 大幹[1]，岡田 麻衣子[3]，倉持 幸司[4]，渡士 幸一[2]，紙透 伸治[1]　([1]麻布大獣医，[2]感染研ウイルス第二部，[3]東京工科大応用生物，[4]東理大理工)

3G05-05　神経成長因子活性を増強する天然物の遺伝子発現解析
○森川 綾音[1]，田中 愛子[1]，鈴木 孝征[2]，小鹿 一[1]　([1]名大院生命農，[2]中部大応生)

3G05-06　糸状菌 *Acremonium persicinum* が産生する抗真菌化合物 ASP2397 の生合成遺伝子の同定とシデロフォア機能の解析
○浅井 良樹[1]，西村 慎一[1,2]，平塚 知成[1,2]，河村 優美[4]，吉田 稔[1,2,3,5]
([1]東大院農・応生工，[2]東大　微生物連携機構，[3]理研CSRS・ケミカルゲノミクス，[4]理研CSRS・分子リガンド標的，[5]理研CSRS・創薬シード)

3G05-07　ステロール標的型天然物を用いた細胞極性とステロールの関係性の探索
○中尾 拳典[1]，菅長 昭文[2]，西村 慎一[2,3]，松山 晃久[2,4]，吉田 稔[2,3,4,5]
([1]東大農・生化工，[2]東大院農・応生工，[3]東大 微生物連携機構，[4]理研CSRS・ケミカルゲノミクス，[5]理研CSRS・創薬シード)

3G05-08　青ジソに含まれるアミロイドβ 42 の凝集阻害物質・DDC の代謝物の合成と活性
○谷輪 厚太，村上 一馬，坂口 嘉紀，入江 一浩　(京大農)

3G05-09　CH/ π相互作用に着目した Aplysiatoxin 単純化アナログの分子動力学解析
○柳田 亮[1]，小林 巧実[2]，権田 敦子[2]，高田 晃児[2]，入江 一浩[2]
([1]香川大農，[2]京大院農)

3G05-10　薬用植物セージからの AhR リガンドの単離・同定
○西野 勝俊[1]，染谷 健太[1]，Riadh Ksouri[2]，石川 敏夫[3]，
礒田 博子[4,5]，入江 一浩[6]，永尾 雅哉[1]　([1]京大院・生命，[2]CBBC・チュニジア，[3]帝京大・医，[4]筑波大院・生命環境，[5]筑波大・地中海・北アフリカ研究センター，[6]京大院・農)

3G05-11　C- メチルフィセチンのラジカル消去活性
○福原 潔[1]，中西 郁夫[2]，大久保 敬[3]，水野 美麗[1]，松本 謙一郎[2]，
大野 彰子[4]　([1]昭和大，[2]放医研，[3]大阪大，[4]国衛研)

3G05-12　2- ペンチルチアゾリジン -4- カルボン酸とその類縁体の抗菌活性
○浮岡 希良々，野下 浩二　(秋田県立大学)

3G05-13　クマリン骨格形成鍵酵素の基質認識における構造活性相関
○関口 茉樹，清水 文一　(東洋大院生命)

3G05-14　ネオエキヌリン B とその誘導体の合成と抗ウイルス活性
○西内 宏太[1]，大橋 啓史[1,2]，古田 将照[1]，増子 巧[1]，大金 賢司[1]，
紙透 伸治[3]，渡士 幸一[1,2]，倉持 幸司[1]　([1]東理大・理工，[2]感染研ウイルス第二部，[3]麻布大・獣医)

3G05-15　新規相互作用部位を付与したアザ - デカリン型 SARS 3CL プロテアーゼ阻害剤の合成と評価
○服部 恭尚[1]，大西 康司[2]，三谷 勇人[2]，小林 数也[2]，赤路 健一[2]
([1]京都薬大共同機器セ，[2]京都薬大薬品化学)

ミーティングルームG 質疑応答コアタイム 13:00～13:30

酵素―糖質代謝関連酵素 / アミノ酸代謝関連酵素，脂質代謝関連酵素 / その他―

3G06-01　*Bifidobacterium* 属細菌のムチン型糖鎖資化経路の解明
○崔 文鶴[1]，後藤 愛那[1]，阪中 幹祥[1]，加藤 紀彦[1]，西本 完[2]，
杉山 友太[3]，栗原 新[4]，吹谷 智[5]，横田 篤[5]，北岡 本光[6]，
片山 高嶺[1]　([1]京大院・生命，[2]農研機構・食品研，[3]京大院・農，[4]近畿大・生物理工，[5]北大院・農，[6]新潟大・農)

3G06-02　ヒト腸内細菌 *Phocaeicola plebeius* のキシラナーゼの発現解析
○辻 省吾[1]，髙木 千尋[1]，林 秀謙[1,2]　([1]前工大院，[2]前工大工工)

3G06-03　RuBisCO 経路を利用した組換え大腸菌によるポリヒドロキシアルカン酸の合成と RuBisCO 評価系への応用
○藤原 悠暉[1]，齋藤 樹理[1]，永田 暁洋[1]，大潟 祥梧[1]，二宮 太樹[2]，
谷口 遼[2]，松本 直己[2]，堀 千明[1]，大井 俊彦[1]，蘆田 弘樹[2]，
松本 謙一郎[1]　([1]北大院工，[2]神戸大人間発達環境学)

3G06-04　配列制御型ポリヒドロキシアルカン酸合成酵素を用いたランダムホモブロック共重合体グリコール酸ポリマーの生合成
○柳川 謙吾[1]，荒井 修造[1]，榊原 早也果[1]，Mareschal Robin[2]，
大井 俊彦[1]，Zinn Manfred[2]，松本 謙一郎[1]　([1]北大院工，[2]HES-SO Valais-Wallis)

3G06-05　脱 *N*- アセチル化された両性多糖に特異的な新規多糖リアーゼ
○武田 穣[1]，宇佐美 亮児[1]，柏原 大輔[1]，近藤 敬子[2]，片平 正人[2]
([1]横浜国大工，[2]京大エネ研)

3G06-06　乳酸菌 *Lactobacillus rhamnosus* 由来 L- ラムノースイソメラーゼの発現と構造解析
○吉田 裕美[1,3]，吉原 明秀[2,3]，倉原 琳[4]，神鳥 成弘[1,3]　([1]香川大・医, 総合生命研究セ，[2]香川大・農，[3]香川大・国際希少糖研究教育，[4]香川大・医, 自律機能生理学)

3G06-07　L- ラムノース代謝経路に関与する L-2- ケト -3- デオキシラムノン酸アルドラーゼの立体選択性の構造基盤の解明
○福原 将太[1]，渡辺 誠也[1,2]，渡邊 康紀[1,3]　([1]愛媛大農，[2]愛媛大沿岸環境科研セ，[3]山形大理)

3G06-08　*Catenulispora acidiphila* 由来α - グルコシダーゼの$\beta\rightarrow\alpha$ループの置換による基質特異性と糖転移活性の改変
○佐分利 亘，森 春英　(北大院農)

3G06-09　*Aspergillus sojae* α - グルコシダーゼ AsojAgdL の立体構造解析
○宮坂 祐希[1]，大八木 彩子[1]，西河 淳[1]，松本 雄治[2]，安武 望[2]，
殿塚 隆史[1]　([1]東京農工大学院農，[2]昭和産業(株)基盤技術研)

3G06-10　麹菌の細胞壁α -1,3- グルカン生合成に関与するα - アミラーゼ AgtA の特性解析
○小泉 亜未[1]，尾形 慎[2]，矢野 成和[3]，宮澤 拳[1]，吉見 啓[4,5]，
佐野 元昭[6]，日髙 將文[1]，仁平 高則[7]，中井 博之[7]，木村 聡[8]，
岩田 忠久[8]，阿部 敬悦[1,5]　([1]東北大院・農，[2]福島大・農，[3]山形大院・理工，[4]京都大院・農，[5]東北大・NICHe，[6]金沢工大・ゲノム研，[7]新潟大・農，[8]東京大院・農)

3G06-11　麹菌 *Aspergillus oryzae* 由来ルチノシダーゼの構造及び酵素学的特性の解析
○廣田 瑠花[1]，真壁 幸樹[2]，田中 良和[3]，塩野 義人[1]，小関 卓也[1]
([1]山形大農，[2]山形大院理工，[3]東北大院生命)

3G06-12　*Microbacterium* 属細菌由来β -*N*- アセチルヘキソサミニダーゼの構造機能相関解析
○玉井 海地[1]，加藤 雄己[2]，河合 広洋[1]，川崎 寿[3]，夏目 亮[1,2]　([1]東電大院・工，[2]東電大・工，[3]東大・生物工学セ)

3G06-13　ウェルシュ菌 *Clostridium perfringens* が持つ糖質加水分解酵素 GH95 の機能解析
○中島 有登，加藤 紀彦，片山 高嶺　(京大生命)

3G06-14　*Thermosipho melanesiensis* 由来の GH130 タンパク質 Tmel_1013 の機能解析
○三井 智子[1]，玉田 梨恵[1]，佐分利 亘[2]，森 春英[2]　([1]北大農，[2]北大院農)

3G06-15　バリオボラックス属細菌由来(R)-β -Phe アミノアシラーゼの cryo 電顕単粒子解析と変異体解析
○棚橋 貴大[1]，加藤 雄己[2]，安達 成彦[4]，川崎 寿[3]，夏目 亮[1,2]　([1]東電大院・工，[2]東電大・工，[3]東大・生物工学セ，[4]高エネ研・物工研)

3G06-16　*Caldanaerobacter subterraneus* 由来 TTE0866 アセチルキシランエステラーゼの構造・機能解析
○佐々本 康平[1,2]，下澤 勇弥[1,2]，氷見山 幹基[1]，森芳 邦彦[3]，
大本 貴士[3]，上垣 浩一[1,4]，西矢 芳昭[2]，中村 努[1]　([1]産総研，[2]摂南大院理工，[3]大阪産技研，[4]近大農)

3G06-17　ユニークな基質特異性を持つ出芽酵母の新規ヘキソキナーゼ
濱田 海斗，磯野 直人，苅田 修一，○梅川 碧里　(三重大生資)

ミーティングルームH 質疑応答コアタイム 9:30～10:00

植物―一次代謝，二次代謝，メタボローム / 植物ホルモン，成長調節物質 / 環境応答，ストレス応答，情報伝達，分化 / 生物間相互作用―

3H02-01　ムラサキのシコニン・アルカニン誘導体生産におけるアシル基転移酵素の機能分化
○押切 春佳[1]，李 豪[2]，渡辺 文太[3]，山本 浩文[4]，矢崎 一史[2]，高梨 功次郎[1,5]　([1]信州大院・総合医理工，[2]京大・生存研，[3]京大・化研，[4]東洋大・生命科学，[5]信州大・理)

3H02-02　シコニン／アルカニン生合成経路で働く geranylhydroquinone 水酸化酵素の基質特異性
○吉村 和貴[1]，渡辺 文太[2]，中川 友喜美[3]，矢崎 一史[3]，高梨 功次郎[4]　([1]信州大・総合理工，[2]京大・化研，[3]京大・生存研，[4]信州大・理)

3H02-03　RNA-Seq 解析を利用したムラサキにおける栄養依存的なシコニン産生抑制機序の推定
○岡田 貴裕[1]，松田 紗良[2]，丸岡 早紀[2]，松本 雄一[2]，末岡 昭宣[3]，渡邉 啓一[2]　([1]佐賀大医，[2]佐賀大農，[3]新日本製薬)

3H02-04　アマランチン合成酵素遺伝子の単離
○今村 智弘[1]，五十棲 規嘉[2]，東村 泰希[1]，宮里 朗夫[2]，大木 進野[2]，森 正之[1]　([1]石川県立大学，[2]北陸先端大)

3H02-05　Production of flavonoid *C*-glucosides in *E. coli* expressing a plant glucosyltransferase
○DORJJUGDER NASANJARGAL，MAYU HATANO，GORO TAGUCHI　(Shinshu Univ.)

3H02-06　ダイズ根圏へのイソフラボン分泌に関与するβ - グルコシダーゼの機能解析
○松田 陽菜子[1]，山崎 由実[1]，森吉 英子[1]，中安 大[1]，高瀬 尚文[2]，岡崎 伸[3]，加賀 秋人[4]，矢崎 一史[1]，杉山 暁史[1]　([1]京都大生存研，[2]京都先端大バイオ環境，[3]東京農工大農，[4]農研機構)

3H02-07　根寄生雑草 *Striga* におけるジベレリン生理作用発現機構に関する研究
○陳 嘉政，高橋 郁夫，竹内 瑞穂，王 建文，中嶋 正敏，浅見 忠男　(東大農)

3H02-08　根寄生雑草防除に向けたジベレリン様活性化合物研究
○竹内 瑞穂，陳 嘉政，王 建文，高橋 郁夫，太田 鋼，下髙原 宏明，姜 凱，中村 英光，中嶋 正敏，浅見 忠男　(東大農)

3H02-09　円柱状のリンゴ樹形はジベレリンの欠乏が原因だった
○中嶋 正敏[1]，渡辺 大智[1]，高橋 郁夫[1]，Jaroensanti-Takana Naiyanate[1]，宮崎 翔[1]，姜 凱[1]，中安 大[2]，和田 雅人[3]，浅見 忠男[1]，水谷 正治[2]，岡田 和馬[3]　([1]東大農，[2]神戸大農，[3]農研機構果樹茶部門)

3H02-10　エチレン様活性化合物が示すジベレリン様活性に関する考察
○野村 明史，髙橋 郁夫，堅固山 裕子，水野 翼，財前 穂波，小山 倫之，竹内 瑞穂，浅見 忠男　(東大農)

3H02-11　植物のエチレン応答に対するシクロプロペン誘導体の影響
○小山 倫之，太田 鋼，浅見 忠男　(東大農)

3H02-12　ハツカダイコン肥大根に含まれる天然変性タンパク質の精製と凍結保護活性に関する研究
○大須田 穂波[1]，原 正和[1,2]　([1]静岡大農，[2]静岡大グリーン研)

3H02-13　デハイドリンセグメントによるリポソームの凍結凝集抑制に関する研究
○木村 友紀[1]，大久保 智博[2]，清水 広介[4]，間賀田 泰寛[4]，朴 龍洙[1,3]，原 正和[1,3]　([1]静岡大農，[2]静大院農，[3]静岡大グリーン研，[4]浜松医大光尖端医学教育研セ)

3H02-14　沈水植物の成長と繁殖に関わる底質の成分解析
○梶原 尚之，荒木 希和子，久保 幹　(立命館大生命)

3H02-15　硫黄欠乏下で発現が上昇する ERF 転写因子の機能解析
○門脇 佑樹，丸山 明子　(九州大農)

3H02-16　植物の硫黄栄養応答における硫酸イオン輸送体 SULTR1;2 と転写因子 SLIM1 のつながり
○松尾 翔大，丸山 明子　(九州大農)

3H02-17　植物免疫抑制剤 NAS1 誘導体が病害抵抗性に及ぼす影響の解析
○草島 美幸，青木 智史，高橋 郁夫，姜 凱，中村 英光，浅見 忠男　(東大院農)

ミーティングルームH 質疑応答コアタイム 10:30～11:00

植物―一次代謝，二次代謝，メタボローム / 植物ホルモン，成長調節物質 / 環境応答，ストレス応答，情報伝達，分化―

3H04-01　植物葉を傷つけるとみどりの香りを急激に生成する仕組みは進化過程でいつどのように獲得されたのか？
田中 萌菜，太田黒 百音，肥塚 崇男，○松井 健二　(山口大農)

3H04-02　コーヒーの芳香成分：テルペン類蓄積に関わる配糖化酵素の探索と機能解析
○井田 美帆，能代 志歩，水野 幸一　(秋田県大生物資源)

3H04-03　原種コーヒー *C. pseudozanguebariae* カフェイン生合成系酵素の機能解析およびその基質特異性決定部位の探索
國久 葉月[1]，井田 美帆[1]，岩根 利奈[1]，ポンセット バレリー[2]，デコック アレキサンダー[2]，○水野 幸一[1]　([1]秋田県大生物資源，[2]IRD-DIADE)

3H04-04　オオムギにおけるグラミン生合成の解析
○石川 恵里加，金井 詞音，須恵 雅之　(東京農大・農化)

3H04-05　オオムギにおけるグラミン生合成遺伝子の探索
○金井 詞音，石川 恵里加，須恵 雅之　(東京農大・農化)

3H04-06　ブラシノステロイド様活性化合物の新規活性評価系の構築
○西川 文太，瀧本 征佑，中川 好秋，宮川 恒　(京都大学)

3H04-07　二種の植物ホルモン信号伝達制御剤 NJ15 耐性変異体の解析
○塩谷 輝[1]，田中 ナイヤネート[1]，宮崎 翔[1]，細井 昂人[2]，田中 啓介[3]，伊藤 晋作[2]，井内 聖[4]，中野 雄司[5]，小林 正智[4]，中嶋 正敏[1]，浅見 忠男[1]　([1]東大農，[2]東京農大バイオ，[3]東京農大ゲノムセ，[4]理研BRC，[5]京大生命)

3H04-08　藍抽出液中の植物に対する生理活性物質の探索
○平山 遼太[1]，木村 駿太[1]，高橋 郁夫[1]，草島 美幸[1]，佐々木 健郎[2]，浅見 忠男[1]　([1]東大院・農生科・応生化，[2]東北医科薬科大・薬)

3H04-09　フェアリー化合物の作用機序解明に向けたシロイヌナズナ有用系統の探索
○伊藤 綾乃[1]，鈴木 智大[1]，崔 宰熏[23]，青木 大地[1]，野村 崇人[1]，岡本 昌憲[1]，河岸 洋和[23]　([1]宇都宮大・バイオ，[2]静岡大・グリーン研，[3]静岡大・農)

3H04-10　標準添加法を用いたミヤコグサにおける植物ホルモン定量法の確立
○橋口 拓勇，福島 公貴，橋口 正嗣，田中 秀典，権藤 崇裕，明石 良　(宮崎大農)

3H04-11　ゴビ砂漠緑化，インドの食料増産を実現する植物成長刺激剤「ソムレ」の紹介
○染井 正徳[1]，染井 秀[1]，栗野 亮二[2]，スネハシ ミシュラ[3]，染井 和子[1]　([1]ソメイヤッコ研究所，[2]グローバル・マーケティング・アソシエーション，[3]ケーアイーアイティー大学)

3H04-12　塩ストレス下のイネにおけるオーキシン代謝物の分析
○礒邊 拓也，宮川 恒　(京大農)

3H04-13　強光下のアスコルビン酸高蓄積への再生系の関与
濱田 あかね[1]，寺井 佑介[1]，小川 貴央[1]，宮城 敦子[2]，川合 真紀[2]，石川 孝博[1]，○丸田 隆典[1]　([1]島根大・生資科・生命工，[2]埼玉大・理工)

3H04-14　高温雄性不稔に関連する Myb 様イネ転写因子のタンパク質機能解析
○戸澤 譲[1]，黒田 隆司[1]，東谷 篤志[2]，川岸 万紀子[3]　([1]埼玉大院理工，[2]東北大院生命科学，[3]農研機構)

3H04-15　ダイズ耐塩性関連遺伝子 *GmTDF-5* のプロモーター解析
○黒澤 まりな，牧野 果子，高木 ひかり，須藤 弘樹，
野口 和斗，小島 俊雄　（茨城大農）

3H04-16　カタラーゼ欠損株における酸化ストレス誘導性細胞死のレドックス調節
○菊樂 香奈[1]，三冨 弦[1]，松浦 恭和[2]，森 泉[2]，小川 貴央[1]，
石川 孝博[1]，丸田 隆典[1]　（[1]島根大院・自然科学，[2]岡山大・植物研）

3H04-17　圧力変化に対する DPPC 二分子膜流動性へ及ぼす不飽和脂肪酸の影響
○上野 弘人，沼 優，楠部 真崇，西本 真琴　（和歌山高専）

ミーティングルームH 質疑応答コアタイム 13:30～14:00

生物科学―糖鎖科学 - 構造，機能，糖鎖工学，その他 / タンパク質・ペプチド科学 - 構造，機能，その他 / 生物工学 - 酵素工学・生物反応工学，生物材料工学，生体医用工学―

3H07-01　二環性シアル酸供与体を活用したジシアリル抗原糖鎖の簡便合成
○豊島 智三[1]，今村 彰宏[1]，石田 秀治[1,2,3]　（[1]岐阜大・応用生物，[2]岐阜大・G-CHAIN，[3]東海国大機構・iGCORE）

3H07-02　二環性シアル酸を用いたα(2,9)ポリシアル酸の合成研究
○加藤 雅大[1]，白崎 淳哉[2,3]，河村 奈緒子[2,3]，田中 秀則[2,3]，
今村 彰宏[1]，石田 秀治[1,2,3]，安藤 弘宗[2,3]　（[1]岐阜大・応用生物，[2]岐阜大・G-CHAIN，[3]東海国大機構・iGCORE）

3H07-03　脂質ラフトの１分子イメージングに向けたラクト系ガングリオシドプローブの合成
○高橋 舞菜[1]，白崎 淳哉[2,3]，河村 奈緒子[2,3]，田中 秀則[2,3]，
今村 彰宏[1]，石田 秀治[1,2,3]，安藤 弘宗[2,3]　（[1]岐阜大・応用生物，[2]岐阜大・G-CHAIN，[3]東海国大機構・iGCORE）

3H07-04　完全にα選択的な Kdo グリコシド化法の開発研究
○浜島 将伍[1,2]，野口 晴佳[3]，河村 奈緒子[4,5]，田中 秀則[2,4,5]，
今村 彰宏[1,2]，石田 秀治[1,2,4,5]，一柳 剛[3]，安藤 弘宗[2,4,5]　（[1]岐阜大・応用生物，[2]岐阜大・連合農学，[3]鳥取大・農，[4]岐阜大・G-CHAIN，[5]東海国大機構・iGCORE）

3H07-05　2 位 *N*- イミドイル保護グルコース供与体を用いた高β選択的グリコシル化反応
○浅野 剛志[1]，宇田川 太郎[2]，河村 奈緒子[3,4]，安藤 弘宗[3,4]，
田中 秀則[3,4]　（[1]岐阜大・応用生物，[2]岐阜大・工，[3]岐阜大・G-CHAIN，[4]東海国大機構・iGCORE）

3H07-06　アラゴナイトナノファイバー形成に関与するアコヤガイ靭帯の新規酸性ペプチド LICP の構造解析
○森岡 太一[1]，岩橋 晴香[1]，池谷 鉄兵[3]，伊藤 隆[3]，片山 秀和[2]，
降旗 一夫[1]，永田 宏次[1]，鈴木 道生[1]　（[1]東京大院農，[2]東海大工，[3]都立大院理）

3H07-07　植物由来抗歯周病菌ペプチドの同定と作用機構解析
○小澤 友弥[1]，張 迷敏[1]，陸 鵬[1]，岡本 研[1]，伊藤 英晃[1]，
鈴木 道生[1]，花田 耕介[2]，柘植 尚志[3]，中曽根 光[4]，米倉 円佳[4]，
永田 宏次[1]　（[1]東大院農生科，[2]九工大院生情工，[3]中部大応生，[4]トヨタ自動車・アグリバイオ事業部）

3H07-08　昆虫由来抗菌ペプチドの黄色ブドウ球菌に対する抗菌活性の特性
○下田 蒼[1]，伊藤 隼哉[2]，仲川 清隆[2]，安藤 太助[1]，米山 裕[1]　（[1]東北大院・農・動物微生物学，[2]東北大院・農・機能分子解析学）

3H07-09　動脈硬化症治療薬開発のための新規ペプチド阻害剤の PURE システムと mRNA ディスプレイ法を用いた探索
○安東 丈洋[1]，冨士 大輔[2]，横山 匠[1]，高守 幸男[1]，堀内 大輔[1]，
山本 美月[3]，川上 隆史[4,5]　（[1]山梨大院・医工農・生命環境，[2]山梨大・生命環境・生命工，[3]山梨大院・医工農・統合応用生命科学，[4]山梨大院・総合研究・生命環境，[5]JST・さきがけ）

3H07-10　フラボノイド化合物による昆虫ステロイドホルモン生合成酵素 Noppera-bo の阻害：構造生物学的解析と生物活性検定
○海老原 佳奈[1]，稲葉 和恵[1]，小祝 孝太郎[2]，髙谷 大輔[3]，
渡邉 千鶴[3]，今村 理世[4]，岡部 隆義[4]，小島 宏建[4]，
佐久間 知佐子[5]，嘉糠 洋陸[5]，藤川 雄太[6]，井上 英史[6]，
本間 光貴[3]，千田 俊哉[2]，丹羽 隆介[1,7]　（[1]筑波大・生命環境，[2]高エネ研・物構研・構造生物，[3]理研(BDR) 制御分子設計，[4]東大・創薬機構，[5]慈恵医大・熱帯医学，[6]東京薬大・生命科学，[7]筑波大・TARA セ）

3H07-11　大腸菌のパスウェイエンジニアリングによるモノテルペノイド高生産系の構築
○宮下 孝洋[1,2]，栗栖 尚嗣[2]，角掛 陽[2]，和氣 駿之[2]，中山 亨[2]，
高橋 征司[2]　（[1]北海道糖業(株)，[2]東北大・院・工）

3H07-12　*Clostridium perfringens* 由来 Toxin-Antitoxin システム MazEF について：分子認識機構と生理機能の考察
○横田 亜紀子[1]，宮本 龍樹[2]，大田 悠里[1,2]，釣賀 雅子[1]，
常田 聡[2]，野田 尚宏[1,2]　（[1]産総研・バイオメディカル，[2]早稲田大院・先進理工）

3H07-13　抗体工学を利用した二重交差性自己抗体の解析
○阿南 優佑[1]，佐々木 栄太[1]，板倉 正典[1]，上田 宏[2]，内田 浩二[1]
（[1]東大院農生科，[2]東工大科学技術創成院）

3H07-14　ベタイン型添加剤の共担持による酵素担持検査紙の保存安定性の向上
○青木 拓真[1]，山本 真史[2]，北村 武大[2]，森田 祐子[2]，甲元 一也[1]
（[1]甲南大FIRST，[2]第一工業製薬(株)）

3H07-15　抗菌剤包接 r- グルカンナノ粒子の抗菌活性
○畦﨑 梨花，甲元 一也　（甲南大FIRST）

ミーティングルーム I 質疑応答コアタイム 9:00～9:30

生物科学―糖鎖科学 - 構造，機能，糖鎖工学，その他 / タンパク質・ペプチド科学 - 構造，機能，その他 / 生物工学 - 酵素工学・生物反応工学，生物材料工学，生体医用工学―

3I01-01　*O*- マンノシル化セリン / スレオニンに対するプラディミシン A の結合評価
○音田 昂志[1]，小鹿 一[1]，五十嵐 康弘[2]，伊藤 幸成[3,4]，中川 優[1,3,5]
（[1]名大院・生命農，[2]富山県大・生工，[3]理研，[4]阪大院・理，[5]iGCORE）

3I01-02　ピレン修飾４糖プローブを用いた endo- α -mannosidase 活性検出
○松尾 一郎[1]，佐野 加苗[1]，石井 希実[1]，黒岩 歩実[1]，森口 朋尚[1]，
栗原 大輝[2]，戸谷 希一郎[2]　（[1]群馬大院理工，[2]成蹊大理工）

3I01-03　新規光反応性基「セレノフェン -2- イル置換型α - ケトアミド」を用いた光親和性スフィンゴ糖脂質プローブの開発と細胞膜ラフト親和性相互作用の理解に向けた応用
○浅野 早知[1,2]，田中 秀則[2,3,4]，今村 彰宏[1,2]，石田 秀治[1,2,3,4]，
矢木 宏和[5]，加藤 晃一[5,6]，水上 大輝[7]，平井 剛[7]，安藤 弘宗[2,3,4]
（[1]岐阜大・応用生物，[2]岐阜大院・連合農学，[3]東海国大機構・iGCORE，[4]岐阜大・G-CHAIN，[5]名市大・院薬，[6]自然科学研究機構・生命創成探究セ，[7]九大院・薬）

3I01-04　フコース含有糖タンパク質合成を目指した糖水酸基保護基の検討
○安藤 達也[1,2]，朝比奈 雄也[1]，北條 裕信[1]　（[1]阪大蛋白研，[2]阪大院理）

3I01-05　チオエーテルを持つ糖受容体を用いた立体選択的グリコシル化の反応機構
須田 栞[1]，田中 萌瑛[1]，杉橋 葵[1]，西田 芳弘[1,2]，○土肥 博史[1,2]
（[1]千葉大院園芸，[2]千葉大分子キラリティーセンター）

3I01-06　Inhibition of ApoE3-mediated cellular uptake of lipid nanoparticles by membrane-anchored lipopeptides
○NANAHARA Masaya[1,2]，SOMIYA Masaharu[2]，
KURODA Shun'ichi[1,2]　（[1]Graduate School of Frontier Biosciences, Osaka Univ.，[2]Institute of Scientific and Industrial Research, Osaka Univ.）

3I01-07　無細胞タンパク質共翻訳によるショウジョウバエのヌクレオソーム再構築
○沖宗 慶一[1]，幡谷 省悟[2]，松本 一樹[1]，後潟 夏菜子[1]，
高須賀 太一[1,2]　([1]北大院国際食資源，[2]北大農)

3I01-08　シアノバクテリアにおける多様な Hsp70(DnaK)シャペロン系に関する生化学的解析
○光島 豊，仲本 準　(埼玉大理工)

3I01-09　TNF-α親和性ヒト Tudor ドメインタンパク質変異体の創出
○牧野 祥嗣，宮本 佳奈，伊藤 伸哉　(富山県大生物工)

3I01-10　ペプチドバーコーディング法による抗 GFP ナノボディの結合能に重要な残基の同定
○松崎 友星[1]，青木 航[1,2]，植田 充美[1,2]　([1]京大院農，[2]JST-CREST)

3I01-11　がん細胞選択的遺伝子治療を想定した抗体 - 膜貫通ペプチド酵素的架橋設計
○中澤 光，安藤 優，三浦 大輔，梅津 光央　(東北大院工)

3I01-12　Novel cDNA display platform for activity-based selection in protein engineering
○DAMNJANOVIC Jasmina[1]，ODAKE Nana[1]，
KOJIMA Takaaki[1]，NEMOTO Naoto[2]，NAKANO Hideo[1]
([1]Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University，[2]Graduate School of Science and Engineering, Saitama University)

3I01-13　正常細胞に作用しない癌細胞選択的プロドラッグ酵素 TEM-1 変異体の開発
○高橋 美穂子，坂本 健作　(国立研究開発法人理化学研究所)

3I01-14　合理的変異導入法を用いる *Xenorhabdus doucetiae* 由来 2- オキソグルタル酸依存型 $_{L}$- ピペコリン酸水酸化酵素の可溶性発現の改善
○板倉 葵[1]，篠田 優[1]，佐々野 晴花[2]，三宅 良磨[2]，川端 潤[2,3]，
浅野 泰久[1]　([1]富山県大・生工研セ，[2]三菱ケミカル(株)，[3](株)エーピーアイコーポレーション)

ミーティングルーム I　質疑応答コアタイム 10:00～10:30

酵素―タンパク質・ペプチド代謝関連酵素，核酸代謝関連酵素 / 酸化還元酵素―

3I03-01　タンパク質チロシン残基ニトロ化修飾の消去酵素 denitrase の探索と解析
○那須野 亮，高木 博史　(奈良先端大・バイオ)

3I03-02　核内エキソソームの分解ターゲットとなる polyA+RNA の解析
○杉元 啓悟[1]，藤原 奈央子[1]，瀬尾 茂人[2]，増田 誠司[1]　([1]京都大学，[2]大阪大学)

3I03-03　ハロアルカンデハロゲナーゼ及びデアミナーゼからなる融合酵素 DahX の tRNA 編集活性
○高橋 由紀子，佐藤 優花里，中鉢 千尋，野々山 翔太，
永田 裕二　(東北大院)

3I03-04　γセクレターゼ変異体の解析に向けた酵母発現・精製系の構築
○関 正義，小川 智久，日高 將文，二井 勇人　(東北大院農)

3I03-05　酵母を用いたスクリーニングによるγセクレターゼサブユニット Aph1 の機能解析
○渡辺 ひかり[1]，吉田 知加[1]，蔡 哲夫[2]，日高 將文[1]，小川 智久[1]，
富田 泰輔[2]，二井 勇人[1]　([1]東北大院農，[2]東大院薬)

3I03-06　細菌由来 L- ラムノース 1- 脱水素酵素の X 線結晶構造解析
○吉原 健太郎[1]，渡辺 誠也[1,2]，渡邊 康紀[1,3]　([1]愛媛大農，[2]愛媛大沿岸環境科研セ，[3]山形大理)

3I03-07　病原性細菌由来 Dipeptidyl peptidase の基質 P2 残基の嗜好性と認識機構の分子基盤
○中村 彰宏[1]，阪本 泰光[2]，鈴木 義之[3]，六本木 沙織[4]，
志田 洋介[1]，田中 信忠[5,6]，小笠原 渉[1]　([1]長岡技科大・工，[2]岩手医大・薬，[3]長岡高専，[4]岩手医大・医，[5]昭和大・薬，[6]北里大・薬)

3I03-08　*Grimontia hollisae* コラゲナーゼの活性部位のヒスチジン残基とチロシン残基の役割
○池内 健晃[1]，林 魁一[1]，滝田 禎亮[1]，森下 諒[1]，銭 鈞[1]，
兒島 憲二[1]，田中 啓友[2]，服部 俊治[2]，保川 清[1]　([1]京大院農，[2]株式会社ニッピバイオマトリクス研究所)

3I03-09　D- アミノ酸アミド加水分解酵素の基質結合部位の充填がジペプチド合成に及ぼす影響
○江良 祐一，有馬 二朗　(鳥取大農)

3I03-10　異化的金属還元菌 *Geobacter sulfurreducens* 由来ロダネーゼ様タンパク質 ExtH の基質特異性およびシステイン残基の役割の解析
○石戸 雄大，ムスト・イシュラット ジャハン，戸部 隆太，
三原 久明　(立命館大生命)

3I03-11　白色腐朽担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* 由来の Class 3 に属するシトクロム P450 CYP505D6 の機能解析
○森 玲香，ワイズ 里沙，酒井 杏匠，志水 元亨，加藤 雅士　(名城大農)

3I03-12　超低栄養性細菌のメタノール脱水素酵素の機能解析
○岸本 真奈，新谷 政己，吉田 信行　(静大院・総合科技)

3I03-13　好熱菌由来色素依存性 L- グルタミン酸脱水素酵素の酵素化学的性質の解析
○伊藤 佑衣[1]，里村 武範[2,3]，岩田 峻弥[2]，櫻庭 春彦[4]，
大島 敏久[5]，末 信一朗[2]　([1]福井大院・工，[2]福井大・工，[3]福井大・生命セ，[4]香川大農，[5]大阪工大)

3I03-14　酵素活性が向上した超好熱菌由来ピロロキノリンキノン依存性アルドース脱水素酵素の創製と酵素化学的性質の解明
○三木 佑介[1]，里村 武範[2]，高村 映一郎[2]，桜庭 春彦[3]，
大島 敏久[4]，末 信一朗[2]　([1]福井大院・工，[2]福井大学・工，[3]香川大・農，[4]大阪工大・工)

3I03-15　リンゴ酸デヒドロゲナーゼの構造変化による触媒残基の switching と基質特異性への寄与
○下澤 勇弥[1,2]，中村 努[2]，氷見山 幹基[2]，佐々本 康平[1,2]，
西矢 芳昭[1]　([1]摂南大院　理工　生命，[2]国立研究開発法人産業技術総合研究所)

3I03-16　グリシンオキシダーゼの構造・機能解析と酵素特性改良
○東浦 優希[1]，小田 龍佑[2]，川崎 大志[2]，西矢 芳昭[1,2]　([1]摂南大院理工生命，[2]摂南大理工生命)

3I03-17　SH 基化学修飾によるオキシダーゼのデヒドロゲナーゼへの改変
○外山 二卯佳，木村 太紀，西矢 芳昭　(摂南大　理工　生命)

3I03-18　好熱菌ラッカーゼによる食品タンパク質の架橋解析
○安藤 兼那太，時下 進一，熊澤 義之　(東薬大生命)

ミーティングルーム I　質疑応答コアタイム 11:00～11:30

環境科学・バイオマス利用―環境保全，浄化技術工学，バイオレメディエーション，環境汚染物質 / バイオマス，バイオマス変換，バイオ燃料，バイオ化成品 / 資源変換，資源再生利用 / バイオ電池関連 / その他―

3I05-01　The interactions between *Pteris vittata* and its rhizosphere contribute to As phytoextraction
○YANG CHONGYANG[1,2]，HAN NING[1]，HO YING-NING[3]，
YANG YU-LIANG[4]，NOJIRI HIDEAKI[2]，
CHIEN MEI-FANG[1]，INOUE CHIHIRO[1]　([1]Tohoku Univ.，[2]BRC UTokyo，[3]NTOU. Taiwan，[4]Academic Sinica. Taiwan)

3I05-02　根圏メタボロミクス解析を起用したヒ素のファイトエキストラクション過程における代謝産物および代謝経路の調査
○韓 凝[1]，楊 重陽[1,2]，ホ インニン[1,3]，楊 玉良[4]，簡 梅芳[1]，
井上 千弘[1]　([1]東北大院・環境，[2]東大・生物工学セ，[3]国立海洋大学，[4]中央研究院)

3I05-03　シロイヌナズナ根の形態形成に及ぼすレアアースの影響
○武田 徹[1,2]，松田 旭生[1]，小嶋 えみり[1]，高貝 俊生[2]　([1]近畿大農，[2]近畿大院農)

3I05-04　High-throughput screening of antibiotic-resistant genes in an urban river, Kanda River by metagenomic analysis
○Xiao Chang[1], Ide Keigo[1,2], Wagatsuma Ryota[1], Nishikawa Yohei[2,3], Matsunaga Hiroko[3], Tominaga Daisuke[2], Takeyama Haruko[1,2,3,4]（[1]Grad. Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ., [2]CBBD-OIL, AIST-Waseda Univ., [3]Res. Org. Nano Life Innov., Waseda Univ., [4]Inst. Adv. Res. Biosyst. Dynam., Waseda Res. Inst. Sci. Eng., Waseda Univ.）

3I05-05　各種プラスチック存在下における下水汚泥中細菌叢の変化
○北村 雄真，前田 憲成，ムスタファ ヌルル･アシファー（九工大院生命体）

3I05-06　有機物含有廃水における硝化能および微生物叢の変化
○飯山 桃子[1]，山下 栞[2]，牧野 陽介[1]，三浦 健[1,2]（[1]東洋大院・生命科学，[2]東洋大・生命科学）

3I05-07　微生物群集解析による生分解性プラスチック分解の影響
○門屋 亨介[1]，田中 尚人[2]，藤田 信之[2]，志波 優[2]，田口 精一[2]（[1]椙山女学園大生活科学，[2]東京農大生命科学）

3I05-08　*Pseudomonas saccharophila* を用いた水溶液からのタングステン酸イオンの除去と回収
○鶴田 猛彦[1]，屋須 雅人[1]，田口 翔太[1]，宮里 匠[2]（[1]八戸工大工，[2]八戸工大院工）

3I05-09　生物鉱物化ペプチド提示シルクによるレアアースの直接回収
○石田 亘広[1]，畠中 孝彰[1]，細川 洋一[1]，小島 桂[2]，飯塚 哲也[3]，寺本 英敏[2]，瀬筒 秀樹[3]，亀田 恒徳[2]（[1]豊田中研，[2]農研機構・新素材開発，[3]農研機構・カイコ機能改変）

3I05-10　淡水性腐食環境に浸漬した様々な金属材料の腐食と微生物群集構造の解析
○若井 暁[1]，宮永 一彦[2]，宮野 泰征[3]，砂場 敏行[4]，水上 裕貴[4]，江野 七海[4]，鹿嶋 賀実[5]，本間 一平[5]，渡邉 光司[5]，小林 将[5]，高井 研[1]（[1]海洋機構超先鋭，[2]東工大生命理工，[3]秋田大理工，[4]INPEX・TRC，[5]INPEX・直江津LNG）

3I05-11　キトサンナノファイバーヒドロゲルを用いた米糠からのフィチン酸の迅速回収
○岩本 博行[1]，新田 祥子[2]（[1]福山大学生命工，[2]福山大学グリーンサイエンス研究センター）

3I05-12　活性汚泥における高石灰化能を持つ微生物の探索と石灰化特性の分析
○吉國 由希久[1]，鈴木 道生[1,2]（[1]東大院農，[2]東大　微生物連携機構）

3I05-13　バイオデバイス構築のための 直接電子移動型酸化還元酵素の創製
○加藤 真海，髙村 映一郎，坂元 博昭，里村 武範，末 信一朗（福井大学）

3I05-14　NAD^+ - カーボンナノチューブを用いたマルチエンザイム型バイオ電池の開発
○木村 美智子[1]，高村 映一郎[1]，坂元 博昭[1]，里村 武範[2,3]，櫻庭 春彦[4]，大島 敏久[5]，末 信一朗[1,2,3]（[1]福井大学院・工・繊維，[2]福井大学・ライフセ，[3]福井大学院・工・生物応用化，[4]香川大農，[5]大阪工大）

3I05-15　好熱菌酵素を素子としたアミノ酸駆動型高耐久性バイオ電池の開発
○里村 武範[1,2]，堀永 晃作[1]，高村 映一郎[1]，坂元 博昭[1]，大島 敏久[3]，櫻庭 春彦[4]，末 信一朗[1]（[1]福井大工，[2]福井大ライフ，[3]大阪工大工，[4]香川大農）

3I05-16　水田土壌細菌叢の NGS 解析と発電菌の同定
○田丸 浩[2,3,4]，林 真由[1]，岡崎 文美[2,3,4]（[1]三重大生資，[2]三重大院生資，[3]三重大・バイオインフォ，[4]三重大・スマートセルイノベ研セ）

3I05-17　効率的な多段階酵素反応系を目指した DNA の相補性を利用した酵素・メディエータ共固定化電極の構築
○高村 映一郎，熊谷 玄太，坂元 博昭，里村 武範，末 信一朗（福井大学）

ミーティングルーム I　質疑応答コアタイム 13:00～13:30

生物科学ー糖鎖科学 - 構造，機能，糖鎖工学，その他 / 生物工学 - 解析技術・方法論，その他ー

3I06-01　複数酵素におけるヒト GlcNAc-1-P 転移酵素との物理的相互作用に必須な領域の限定
○高橋 哲夫，大城 理樹（東海大工生命化学）

3I06-02　酵母 split-ubiquitin システムを用いたヒト DPMS とヒト PIG-M 間の物理的相互作用の解析
○後藤 菜々美，大城 理樹，高橋 哲夫（東海大工生命化学）

3I06-03　*Sphingobacterium* 属細菌由来新奇シアル酸ピルビン酸リアーゼ（SPL）の酵素学的性質の解析
○中川 貴博[1,2]，岩木 佑弥[1,2]，呉 迪[1,2,3]，羽根 正弥[1,2,3]，佐藤 ちひろ[1,2,3]，北島 健[1,2,3]（[1]名大・生物機能セ，[2]名大院・生命農，[3]糖鎖生命コア研究拠点・名大）

3I06-04　*Prevotella melaninogenica* の産生する宿主糖タンパク質糖鎖遊離酵素の立体構造解析
大倉 和貴，森 真司，神谷 信夫，宮原 郁子，○伊藤 和央（阪市大・院理）

3I06-05　Sialylation plays critical roles in embryogenesis in medaka
○Wu Di[1,2,3], Fujita Akiko[1], Hashimoto Hisashi[4], Hibi Masahiko[4], Taniguchi Yoshihito[5], Kamei Yasuhiro[6], Sato Chihiro[1,2,3], Kitajima Ken[1,2,3]（[1]Biosci. Biotech. Center, [2]Grad. Sch. Bioagr. Sci., [3]Institute for Glyco-core Research (iGCORE), Nagoya Univ., [4]Grad. Sch. Sci., Nagoya Univ., [5]Kyorin Univ. Sch. Med., [6]Nat. Inst. Basic Biol.）

3I06-06　タンパク質の可溶化メカニズムの解明に向けた含意関係に基づく新たなデータ分析技法の開発
○榊原 一紀，尾崎 裕樹，中村 正樹，篠田 優，浅野 泰久（富山県立大学）

3I06-07　網羅的変異スキャンによる転写制御因子 XylS のリガンド特異性の改変
○小川 友希[1]，勝山 陽平[1,2]，大西 康夫[1,2]（[1]東大院・農生科・応生工，[2]東大・微生物イノベ連携機構）

3I06-08　効率的物質生産を実現する新規トランスポーター探索技術の開発
○七谷 圭，増田 歩，石井 智子，伊藤 隼哉，勝部 哲，米山 裕，仲川 清隆，阿部 敬悦（東北大農）

3I06-09　ミトコンドリアゲノム編集（mito-CRISPR）システムの開発とその応用
○天井 貴光，辻 知佳，植田 充美，黒田 浩一（京大院農）

3I06-10　大規模マイクロサテライトデータベース「MiCAPs」の紹介
○田中 啓介（東京農大ゲノムセ）

3I06-11　新型コロナウィルスを認識する DNA アプタマーの作製と迅速検出法の構築
○大坪 嘉行，永田 裕二（東北大院生命）

3I06-12　カイコを用いたウイルス様粒子への効率的な抗原提示システムの開発
○関口 智史[1]，徐 剣[2]，加藤 竜也[3]，朴 龍洙[3]（[1]静大・総科技院，[2]中国華東師範大学・生命科学府・医学合成生物研究センター，[3]静大グリーン研）

3I06-13　ノロウイルスの高感度オンサイト検出に関する研究
○敦賀 健太，アンカン チョードリー，朴 龍洙（静岡大農）

3I06-14　イヌの肥満細胞腫における遺伝子変異の簡易・迅速な検出
○奥村 史朗[1]，日下 芳友[1]，大里 義治[2]（[1]福岡県工技セ，[2]有限会社カホテクノ）

3I06-15　DNA 免疫を用いたウサギモノクローナル抗体取得法の開発
○木原 もなみ[1]，アディネゴロ ダッファ ショーン[1]，兒島 孝明[1]，長谷 哲成[2]，榎本 篤[2]，中野 秀雄[1]（[1]名大院生命農，[2]名大院医）

ミーティングルーム J 質疑応答コアタイム 9:30～10:00

動物―細胞 - 情報伝達，細胞応答，分化制御 / 細胞 - 細胞機能，細胞骨格，オルガネラ，輸送体，細胞接着，細胞内輸送 / 遺伝子 - 構造，発現制御，機能，修飾，トランスクリプトーム，エピジェネティクス , ゲノミクス，ゲノム編集―

3J02-01 Notch シグナルと TGF-βシグナルの相互依存的な作用が粘膜型マスト細胞の分化を促進させる
○中野 信浩[1]，才田 一樹[1,2]，北浦 次郎[1]，八代 拓也[2]，西山 千春[2]，奥村 康[1]，小川 秀興[1]（[1]順天堂大院医，[2]東理大基礎工）

3J02-02 腸内細菌代謝産物スカトールは，AhR 活性化と p38 の活性化に伴う TNFα/TNFR1 経路を介して腸管細胞の細胞死を導く
○石井 克範[1]，古東 義仁[2]，蔵田 航一[3]，清水 英寿[4]（[1]島大・生資，[2]島大院・自然，[3]島大院・生資，[4]島大・学術）

3J02-03 Expression regulation mechanism of SLC26A3 by indole-3-acetic acid is different in culture stages of Caco-2 cells
○Chowdhury Md. Mazharul Islam[1]，Koto Yoshihito[2]，Kurata Koichi[3]，Ishii Katsunori[4]，Tomii Ayame[4]，Nishimura Kohji[1,2,3,4,5]，Shimizu Hidehisa[1,2,3,4,5]（[1]United Grad. Sch. Agr. Sci., Tottori Univ.，[2]Grad. Sch. Nat. Sci. Tech, Shimane Univ.，[3]Grad. Sch. Life. Envi. Sci, Shimane Univ.，[4]Fac. Life. Envi. Sci, Shimane Univ.，[5]Inst. Agr. Life. Sci., Aca, Ase, Shimane Univ.）

3J02-04 低分子量 G タンパク質 RhoQ は TGF-β1 誘導性 EMT を抑制する
○佐藤 琴音[1]，野崎 未紗[2]，西塚 誠[1,2]（[1]弘大農生，[2]弘大院地域共創）

3J02-05 低分子量 G タンパク質 RhoJ は TGF-β/Smad シグナルを介し，非小細胞肺がんの EMT を抑制する
○野崎 未紗[1]，西塚 誠[1,2]（[1]弘大院地域共創，[2]弘大農生）

3J02-06 Methylglyoxal is Involved in Insulin Resistance via Activation of mTORC1/S6K Pathway in Adipocytes
○NG Su Ping[1]，Nomura Wataru[1,2]，Takahashi Haruya[1]，Inoue Kazuo[1,2]，Goto Tsuyoshi[1,2]，Kawada Teruo[1,2]，Inoue Yoshiharu[3]（[1]Div. of Food Sci. & Biotechnol., Grad. Sch. of Agric., Kyoto Univ.，[2]Research Unit for Physiological Chemistry, Kyoto Univ.，[3]Div. of Applied Life Sciences, Grad. Sch. of Agric., Kyoto Univ.）

3J02-07 ヒト多剤輸送体 MDR1 の基質依存的活性がコレステロールによって誘導される機構の熱力学的解析
○岩村 紗花[1]，木岡 紀幸[1]，植田 和光[2]，木村 泰久[1]（[1]京大院・農・応用生命，[2]京大・iCeMS）

3J02-08 リポソームを用いたヒト ABCA1 のステロール特異性解析
○坂田 和樹[1]，木岡 紀幸[1]，植田 和光[2]，木村 泰久[1]（[1]京都大農，[2]京都大・iCeMS）

3J02-09 27-hydroxycholesterol 産生に基づくミトコンドリアへのコレステロール輸送の評価
○小澤 光，齋藤 穂高，佐藤 隆一郎，山内 祥生（東大院・ 農生科・応生化）

3J02-10 脂質輸送タンパク質を介したコレステロール恒常性制御
○齋藤 穂高，山内 祥生，佐藤 隆一郎（東大院・農生科・応生化）

3J02-11 INSIG を介した酸化ステロールによる細胞死誘導機構
○渡邉 雄一，三吉 翔子，清水 誠，山内 祥生，佐藤 隆一郎（東大院・農生科・応生化）

3J02-12 ZIP8 媒介金属による細胞内の亜鉛及びマンガンホメオスタシスの撹乱
○長松 詩野[1]，西藤 有希奈[1,2]，神戸 大朋[1]（[1]京大院生命，[2]京都薬科大薬）

3J02-13 Cryo-EM 解析を目指した脂質輸送型 ABC 蛋白質の生産・調製基盤の構築
○小段 篤史[1]，光岡 薫[2]，木村 泰久[3]，木岡 紀幸[3]，植田 和光[1]（[1]京大高等研究院iCeMS，[2]阪大超高圧電顕センター，[3]京大院農）

3J02-14 抗がん剤排出トランスポーター ABCG2 のプロテインキナーゼによる発現および機能制御機構の解析
○牧平 実紀，小森 由輝，西出 高大，谷口 友啓，藤井 鈴，三谷 匡，田口 善智（近畿大生物理工遺伝子）

3J02-15 GATA2 と PU.1 による粘膜型マスト細胞特異的遺伝子の発現制御機構
○井上 真理子，秋元 悠太，長田 和樹，笠倉 和巳，八代 拓也，西山 千春（東理大基工）

3J02-16 転写因子 Eomesodermin で促進される IFN-γ発現における NF-κB 経路の役割
○田中 裕美子[1]，中尾 彩香[1]，三宅 靖延[2]，谷垣 里穂[1]，東 幸奈[1]，片岡 孝夫[1]（[1]京都工芸繊維大学・応生，[2]佐賀大学・医）

3J02-17 分泌型ルシフェラーゼを用いた UCP1 レポーター前駆脂肪細胞株の樹立
○川原崎 聡子[1]，鄭 惠芬[1]，高橋 春弥[1]，野村 亘[1,2]，神戸 大朋[3]，井上 和生[1]，河田 照雄[1,2]，後藤 剛[1,2]（[1]京大院農・食品生物，[2]京大・生理化学研究ユニット，[3]京大院生命・統合生命）

3J02-18 前帯状皮質による海馬活性調節を介する恐怖記憶汎化制御
○長廏 大海，喜田 聡（東大院・農学生命科学・応用生命化学）

ミーティングルーム J 質疑応答コアタイム 10:30～11:00

動物―細胞 - 情報伝達，細胞応答，分化制御 / 個体 - 生理・栄養・代謝， 生体機能，生体制御，メタボローム / タンパク質 - 構造，機能，活性，修飾，分解，局在，プロテオーム―

3J04-01 SORBS タンパク質は間葉系幹細胞の未分化状態維持に関わるメフリンの発現量を調節する
○高橋 真助[1]，柴原 正和[1]，榎本 篤[2]，木村 泰久[1]，木岡 紀幸[1]（[1]京都大農，[2]名古屋大医）

3J04-02 Osteogenetic oligodeoxynucleotide（osteoDN）induces mineralization independently of TLR9
○Nihashi Yuma[1]，Miyoshi Mana[2]，Umezawa Koji[2,3]，Shimosato Takeshi[1,2,3]，Takaya Tomohide[1,2,3]（[1]Grad Sch Med Sci Tech, Shinshu Univ，[2]Fac Agr, Shinshu Univ，[3]IBS, Shinshu Univ）

3J04-03 Myogenetic oligodeoxynucleotide（myoDN）suppresses inhibit adipocyte differentiation
○MORIOKA Kamino[1]，MITANI Takakazu[1]，UMEZAWA Koji[1,2]，SHIMOSATO Takeshi[1,2]，TAKAYA Tomohide[1,2]（[1]Fac Agr, Shinshu Univ，[2]IBS, Shinshu Univ）

3J04-04 M2 型マクロファージの極性化におけるトランスグルタミナーゼの機能解析
○篠田 祥希，辰川 英樹，人見 清隆（名大院創薬科学）

3J04-05 Myogenetic oligodeoxynucleotide（myoDN）suppresses proliferation and induces differentiation of vascular smooth muscle cells
○MIYOSHI Mana[1]，NIHASHI Yuma[2]，UMEZAWA Koji[1,3]，SHIMOSATO Takeshi[1,2,3]，TAKAYA Tomohide[1,2,3]（[1]Fac Agr, Shinshu Univ，[2]Grad Sch Med Sci Tech, Shinshu Univ，[3]IBS, Shinshu Univ）

3J04-06 線虫 C. elegans の休眠を制御する短鎖神経ペプチド受容体の探索
○小野 真弘[1]，松下 健次郎[2]，松永 洋平[3]，岩崎 崇[1,2]，河野 強[1,2]（[1]鳥取大学大学院・連農，[2]鳥取大学大学院・持続性，[3]株式会社 SRL）

3J04-07 フタホシコオロギのビタミン E 代謝とビタミン E 欠乏症状
○齋藤 紘輔，森田 真由，竹中 麻子（明治大農）

3J04-08 線虫のビタミン C 生合成経路の同定とビタミン C 新機能の探索
○永田 隆太[1]，青木 優果[1]，苅谷 あゆみ[1]，和田 滉佑[1]，柳本 綾子[1]，原 寛佳[1]，岡本 奈穂[2]，美藤 友博[1,2]，吉田 晋一[3]，石原 亨[1,2]，渡邊 文雄[1,2]，藪田 行哲[1,2]（[1]鳥取大学農学部，[2]鳥取大学大学院連合農学研究科，[3]鳥取県産技センター）

3J04-09　ネコ腎臓に蓄積する特異な分岐脂肪酸を有するトリグリセリドの発見
○市沢 翔太，上野山 怜子，宮崎 雅雄　（岩手大農）

3J04-10　ネコのマタタビへの擦り付け行動は蚊の化学防除を可能にする
○上野山 怜子[1]，宮崎 珠子[1]，Jane L. Hurst[2]，
Robert J. Beynon[2]，安立 昌篤[3,4]，小野田 伊吹[3]，西川 俊夫[3]，
宮崎 雅雄[1]　([1]岩手大院総合科学，[2]University of Liverpool，[3]名古屋大院生命農学，[4]東北大院薬)

3J04-11　発情期の雌イヌの尿中に排出される性フェロモンの探索
○小野澤 麗，上野山 怜子，宮崎 珠子，宮崎 雅雄　（岩手大学）

3J04-12　ヒトおよびマウス骨格筋由来細胞外小胞のプロテオミクス解析
○渡辺 祥[1]，須藤 優里[1]，櫻井 英俊[2]，佐藤 隆一郎[1]，山内 祥生[1]
([1]東大院・農生科・応生化，[2]京大・CiRA)

3J04-13　家畜用プロバイオティクス *Bacillus hisashii* を給与した豚におけるプロテオーム解析
○岡本 拓也[1]，鷺 陽香[1]，西内 巧[2]，宮本 浩邦[1,3,4]，佐藤 成樹[5]，
児玉 浩明[1]　([1]千葉大院・園芸，[2]金沢大・学際，[3]サーマス，[4]理研・IMS，[5]千葉大院・理学)

3J04-14　細胞質硫酸転移酵素の核内受容体応答に対する網羅的な発現定量解析
○黒木 勝久[1]，玉井 健一郎[1]，大田 輝[1]，眞鍋 曜子[1]，
Liu Ming-Cheh[2]，水光 正仁[1]，榊原 陽一[1]　([1]宮崎大農，[2]トレド大薬)

3J04-15　N-ミリストイル化依存的にミトコンドリアに特異的に局在する N-ミリストイル化タンパク質の探索
○原田 春菜[1]，七田 真由[1]，守屋 康子[1]，小渕 浩嗣[2]，内海 俊彦[1]
([1]山口大院創成科，[2]岡山大院医歯薬総合)

ミーティングルーム J　質疑応答コアタイム 13:30～14:00

動物―細胞 - 細胞機能，細胞骨格，オルガネラ，輸送体，細胞接着，細胞内輸送 / 個体 - 生理・栄養・代謝，生体機能，生体制御，メタボローム / タンパク質 - 構造，機能，活性，修飾，分解，局在，プロテオーム―

3J07-01　細胞内のアクチン繊維形成は THz 光照射によって促進される
○細木 亮輔[1]，山崎 祥他[2]，上野 佑也[1]，保科 宏道[2]，小川 雄一[3]，
原田 昌彦[1]　([1]東北大農，[2]理研，[3]京大農)

3J07-02　化学誘導性二量体化を用いた PIP5K の接着斑一過的局在化システムの開発
○増元 亮裕，木村 泰久，木岡 紀幸　（京都大学）

3J07-03　細胞の細胞外マトリックスの硬さ感知に関与する新規タンパク質の同定
○田辺 修平，柴原 正和，立花 大，木村 泰久，木岡 紀幸　（京都大院農）

3J07-04　接着斑細胞膜と GPMV 法で単離した細胞膜の脂質組成の比較
○立花 大[1]，箕浦 広大[1]，長尾 耕治郎[2]，木村 泰久[1]，植田 和光[3]，
木岡 紀幸[1]　([1]京大院農，[2]京大院工，[3]京大iCeMS)

3J07-05　マクロファージによる凝固・線溶系因子の発現と血小板凝集に及ぼすトリメチルアミン - N - オキシド(TMAO)の影響
○鈴木 健之[1]，AN Ni[1]，佐々木 翼[2]，松下 七海[2]，三浦 徳[3]，増澤（尾崎）依[2]，細野 崇[1,2]，関 泰一郎[1,2,3]　([1]日大院・生資科・応生科，[2]日大・生資科・生命化，[3]日大・生資科・総合研究所)

3J07-06　低タンパク質食摂取時の血中可溶性レプチン受容体増加がレプチンの食欲抑制作用に与える影響
○内山 瑞稀[1]，竹中 麻子[2]　([1]明治大院農，[2]明治大農)

3J07-07　タンパク質欠乏が血中グルカゴン濃度に及ぼす影響
○矢崎 純奈，荒木 雅弥，竹中 麻子　（明治大農）

3J07-08　タンパク質欠乏時の肝臓脂肪と脂肪滴形成タンパク質量の経時変化
○鶴田 泰崇[1]，荒木 雅弥[2]，小田巻 静香[2]，竹中 麻子[2]　([1]明治大院農，[2]明治大農)

3J07-09　肝臓 VLDL 受容体遺伝子発現の性差
○曹 玖祥[1]，加藤 拓[1]，佐藤 遼太[1]，横堀 友希[2]，竹中 麻子[2]　([1]明治大院農，[2]明治大農)

3J07-10　腸内細菌叢と宿主の共役的なポリアミン代謝は 大腸の上皮増殖とマクロファージ分化を調節する
○中村 篤央[1,2]，栗原 新[3]，松本 光晴[2]，長谷 耕二[1]　([1]慶應大薬，[2]協同乳業，[3]近畿大生物理工)

3J07-11　創薬に有用な熱安定型セルピンの創出と開発戦略
○山本 拓実，綿谷 凌，恩田 真紀　（大阪府立大・理・生物）

3J07-12　セルピン病治療薬開発に有用な標的分子模倣体の創出
○品田 紗智子，恩田 真紀　（大阪府立大・理・生物）

3J07-13　セルピンポリマーの凝集体形成機構
米倉 百音，○恩田 真紀　（大阪府立大・理・生物）

3J07-14　「低密度リポタンパク質における酸化リン脂質修飾構造の解析」
○大塚 優人[1]，青山 拓生[1]，平出 直哉[1]，内田 浩二[2]，柴田 貴広[1]
([1]名大院生命農，[2]東大院農生科)

3J07-15　脂質輸送体 ABCA1 の HDL 産生活性およびコレステロールフロップ活性の調節
○小笠原 史彦[1]，岡本 雄介[2]，木村 泰久[2]，木岡 紀幸[1,2]，
植田 和光[1]　([1]京大iCeMS，[2]京大院農)

3J07-16　アスコルビン酸の関与するピロール化タンパク質の形成
○吉武 淳[1]，柴田 貴広[2]，内田 浩二[3]　([1]名大 未来社会，[2]名大院・生命農学，[3]東大院・農学生命)

講演番号　　演　題　　発表者氏名(所属)

ミーティングルームA 質疑応答コアタイム 9:00～9:30

微生物―細胞 - 構造，オルガネラ，小胞，分泌，細胞構成分子 / 物質生産 - 醸造，発酵（一次代謝産物）/ 物質生産 - 微生物変換，微生物酵素反応―

4A01-01　黄色ブドウ球菌由来メンブレンベシクル中に内包される病原因子の特性解析
○山梨 佑花[1]，島村 裕子[1]，小室 岬[2]，佐々木 邦明[2]，増田 修一[1]
([1]静岡県大院・薬食生命，[2]岩手大・電子顕微鏡室)

4A01-02　Increase of extracellular membrane vesicle production by deletion of genes involved in outer membrane-peptidoglycan linkage of *Shewanella vesiculosa* HM13
○Zhu Mengshan[1]，Ogawa Takuya[1]，Kawamoto Jun[1]，Imai Tomoya[2]，Kurihara Tatsuo[1]　([1]Institute for Chemical Research, Kyoto University，[2]Research Institute for Sustainable Humanosphere, Kyoto University)

4A01-03　*Shewanella vesiculosa* HM13 の菌体外膜小胞への積荷タンパク質輸送機構における表層多糖の生理的役割
○釜阪 紘平，川本 純，小川 拓哉，栗原 達夫　(京都大学化学研究所)

4A01-04　糸状菌の菌糸生長における細胞柔軟性と生長速度のトレードオフ
○山本 里穂[1]，福田 紗弓[1]，柳沢 直樹[2]，高谷 直樹[1]，佐藤 良勝[2]，竹下 典男[1]　([1]筑波大・生命環境 / MiCS，[2]名古屋大・ITbM)

4A01-05　有機塩素系殺虫剤分解能を持つスフィンゴモナッド細菌株の membrane vesicle 形成と vesicle が有する DNA
○鈴木 達也[1]，相馬 隆光[2]，加藤 広海[1]，豊福 雅典[3,4]，野村 暢彦[3,4]，永田 裕二[1]　([1]東北大学大学院・生命科学研究科，[2]筑波大学大学院・生命環境科学研究科，[3]筑波大学・生命環境系，[4]筑波大学・微生物サステイナビリティ研究センター)

4A01-06　*Aspergillus oryzae* 菌体内グルタチオン蓄積量に対する光照射の影響
○服部 領太，楠本 憲一，鈴木 聡，鈴木 忠宏　(農研機構)

4A01-07　一細胞自家蛍光シグネチャーに基づく非破壊的な油脂生産性の予測
○平山 智弘[1]，八幡 志央美[2]，風間 春香[3]，高久 洋暁[3]，野村 暢彦[2,4]，八幡 穣[2,4]　([1]筑波大院・生命環境科学，[2]筑波大・生命環境系，[3]新潟薬科大・応用生命科学，[4]筑波大・微生物サステイナビリティ研究センター)

4A01-08　糸状菌類を用いたスクアレン高蓄積培養条件の検討
○須波 和[1]，崎浜 靖子[2]，橋本 誠[2]，橋床 泰之[2]　([1]北海道大農，[2]北海道大院農)

4A01-09　メタ連続発酵プロセスにおける希釈率が及ぼす影響の解明
○古閑 友紀[1]，関谷 和真[1]，宮本 浩邦[2,3,4]，田代 幸寛[1]，酒井 謙二[1]
([1]九大・農，[2]千葉大・園芸，[3]理研・生命化学科，[4](株)サーマス)

4A01-10　外膜脱離型シアノバクテリア細胞は農作物生産を増進させる物質群を分泌生産する
○児島 征司，奥村 泰章　(パナソニック(株)テクノロジー本部)

4A01-11　キナ酸からプロトカテク酸を産生するための酢酸菌のペリプラズミック代謝工学
○永木 翔[1]，松谷 峰之介[2]，片岡 尚也[1,3,4]，松下 一信[1,3,4]，薬師 寿治[1,3,4]　([1]山口大院創成科学，[2]東農大ゲノム解析セ，[3]山口大農，[4]山口大中高温微セ)

4A01-12　グルコノバクター属酢酸菌の膜結合型グルコース脱水素酵素によるラクトビオン酸生産と二糖類酸化の改善
○内田 侑里[1]，ケオケン トラポン[2]，片岡 尚也[1,3,4]，松下 一信[1,3,4]，薬師 寿治[1,3,4]　([1]山口大院創成科学，[2]ラオス国際大学自然科学，[3]山口大農，[4]中高温微研セ)

4A01-13　Molybdopterin dependent AldFGH aldehyde dehydrogenase plays a major role on acetaldehyde oxidation in acetic acid fermentation by *Gluconacetobacter diazotrophicus*
○MIAH RONI[1]，Murate Takeru[1]，Kataoka Naoya[1,2,3]，Matsushita Kazunobu[1,2,3]，Yakushi Toshiharu[1,2,3]　([1]Grad. Sch. Sci. Tech. Innov., Yamaguchi Univ.，[2]Fac. Agric., Yamaguchi Univ.，[3]RCTMR, Yamaguchi Univ.)

4A01-14　*Gluconobacter japonicus* NBRC 3271 を宿主とした効率的 5- ケトグルコン酸生産技術の開発
○直木 琴音[1]，片岡 尚也[1,2]，薬師 寿治[1,2]，松下 一信[1,2]　([1]山口大院創成科学，[2]山口大中高温微セ)

ミーティングルームA 質疑応答コアタイム 10:00～10:30

微生物―遺伝子 - 構造，機能 / 細胞 - 分離，分類，生態 / 物質生産 - 醸造，発酵（一次代謝産物）―

4A03-01　Replication-Cycle Reaction 法による環境試料中の環状 DNA の検出とその塩基配列の解読
○森 光矢[1]，奈良 聖亜[2]，末次 正幸[2]，金原 和秀[1]，新谷 政己[1,3]
([1]静大院・総合科技，[2]立教大院・理，[3]静大・グリーン研)

4A03-02　多摩川流域における薬剤耐性遺伝子の伝播を担うプラスミドの収集と比較
○中道 孝一朗[1]，金子 健成[1]，森 光矢[1]，森内 良太[2]，道羅 英夫[2]，金原 和秀[1]，二又 裕之[1,2]，新谷 政己[1,2]　([1]静岡大院・総合科技，[2]静岡大・グリーン研)

4A03-03　グラム陽性菌を対象とした RP4 系プラスミドの接合伝達における *oriT* 最小領域の特定
○深田 悠太[1]，猪又 俊輔[2]，片岡 正和[1]　([1]信州大院・生命医工，[2]信州大工・物質化学)

4A03-04　*Acidithiobacillus ferrooxidans* における CRISPR システムを用いた遺伝子発現抑制技術の開発
○山田 祥平，高妻 篤史，渡邉 一哉　(東薬大生命)

4A03-05　鉄硫黄酸化細菌 *Acidithiobacillus ferrooxidans* を宿主とした組換え発現系の構築
○金尾 忠芳[1]，扇元 修志[1]，國久 智紀[2]，田村 隆[1]，上村 一雄[1]
([1]岡山大院・環境生命，[2]岡山大農)

4A03-06　好塩性セルラーゼ生産菌の探索と諸性質の解析
○柳沢 圭吾[1]，伊藤 翼[1]，嶋根 康弘[2]，峯岸 宏明[1,2]　([1]東洋大学，[2]海洋研究開発機構)

4A03-07　好塩性古細菌 *Halorubrum* sp. 176-9, 590-2 の UV 耐性メカニズム解析
○小宮山 寿紗[1]，嶋根 康弘[2]，峯岸 宏明[1,2]　([1]東洋大学，[2]海洋研究開発機構)

4A03-08　強酸性環境からの微生物の培養と分離
○友居 昌慶[1]，加藤 真悟[2]，伊藤 隆[2]，平井 美穂[3]，高木 善弘[3]，布浦 拓郎[3]，大熊 盛也[2]，跡見 晴幸[1]　([1]京大院工・合成生化，[2]理研BRC-JCM，[3]海洋機構)

4A03-09　高濃度 CO_2 適応と窒素固定能を備えた微生物群集の解析
○飯田 遥貴，油井 信弘，藤井 克彦　(工学院大先進工)

4A03-10　乳酸菌におけるカフェインの影響について
○齊藤 可剛[1]，佐藤 裕謙[2]，下御領 結衣[2]，水木 徹[3]，三浦 健[1,2,4]
([1]東洋大院・生命科学，[2]東洋大・生命科学，[3]東洋大・バイオナノエレクトロニクス研究センター，[4]東洋大・ ライフイノベーション研究所)

4A03-11　深部地下圏でメトキシ芳香族化合物分解を担う新規共生細菌の生存戦略
○坂本 幸子[1]，延 優　小西[2]，眞弓 大介[3]，玉澤 聡[2,4]，中原 望[2]，草田 裕之[2]，米林 英治[5]，岩間 弘樹[5]，五十嵐 雅之[5]，若山 樹[5]，前田 治男[3,5]，坂田 将[3]，田村 具博[2]，野村 暢彦[1]，鎌形 洋一[2]，玉木 秀幸[1,2]　([1]筑波大院・生命，[2]産総研・生物プロセス，[3]産総研・地圏資源，[4]幌延地圏環境研究所，[5]国際石油開発帝石株式会社)

4A03-12　野生酵母 MC87-46 の糖資化能が清酒の味に及ぼす影響
○堤 星太郎[1]，家田 明音[1]，三井 俊[2]，伊藤 彰敏[2]，志水 元亨[1]，加藤 雅士[1]（[1]名城大院農，[2]あいち産業科学技術総合センター・食品工業技術センター）

4A03-13　酵母によるフェノール臭物質産生機構
○土信田 有紀，齊藤 美邑，尾形 智夫（前橋工科大生物工学科）

4A03-14　実用酵母株の代謝フラックス解析による発酵能力と代謝熱の関連の解析
谷田部 楓太，岡橋 伸幸，清家 泰介，○松田 史生（阪大情報）

4A03-15　ラボスケールとプラントスケールの清酒成分プロファイリング比較解析
○岩橋 佑真[1,2]，小松 夕子[1]，小林 拓嗣[1]，矢澤 彌[1]，岩下 和裕[1,2]（[1]酒類総合研究所，[2]広島大院・統合生命）

4A03-16　麹と植物由来の糖セラミドの腸内細菌代謝に与える影響の違いの解析
○戴 鳳凰[1]，永留 真優[1]，満生 萌水[1]，田中 猛豪[1]，中山 二郎[2]，北垣 浩志[1]（[1]佐賀大学，[2]九州大学）

ミーティングルームB 質疑応答コアタイム 9:30～10:00

微生物―細胞 - 分離，分類，生態 / 物質生産 - 醸造，発酵（一次代謝産物）/ 遺伝子 - 構造，機能―

4B02-01　環境土壌における葉酸資化性菌の分布
○土肥 裕希[1,2]，前田 典歩[1]，高谷 直樹[1,2]（[1]筑波大・生命環境，[2]筑波大・MiCS）

4B02-02　植物病原菌 *Pseudomonas syringae* における Quorum Sensing 機構の多様性解析
○諸星 知広[1]，大嶋 旭昇[1]，謝 肖男[2]，染谷 信孝[3]（[1]宇大院地域創生，[2]宇大バイオ，[3]農研機構）

4B02-03　自家熱型高温好気消化液から植物成長促進・抗植物病原性を持つ有用微生物の分離と検証
○吉村 萌梨，SALMAN Alsayeda Zahra，近藤 宜希，井上 宙夢，田代 幸寛，酒井 謙二（九州大農）

4B02-04　*Pseudomonas baetica* SN4 株および細胞外多糖が植物にもたらす生理機能
○施 書琦[1]，西田 彩夏[1]，梶原 悠[2]，井藤 俊行[2]，渡邊 健吾[1]，須田 栞[1]，土肥 博史[1]，宮本 浩邦[1,3,4]，児玉 浩明[1]（[1]千葉大院・園芸，[2]京葉プラントエンジニアリング，[3]サーマス，[4]理研・IMS）

4B02-05　オオムギ根圏の共生微生物の単離と同定
○木代 勝元[1]，最相 大輔[1]，山下 純[1]，山地 直樹[1]，山本 敏央[1]，門田 有希[2]，持田 恵一[3]，中川 智行[4]，谷 明生[1]（[1]岡大植物研，[2]岡大院環境生命，[3]理研CSRS，[4]岐阜大応生）

4B02-06　バラから単離した酵母を用いたカプロン酸高生産株への育種
○大谷 里菜[1]，松尾 啓史[2]，塩谷 瑞紀[1]，長谷川 哲哉[1]，古家 美紀[1]，清水 浩美[3]，大橋 正孝[3]，倉田 淳[1]，上垣 浩一[1]（[1]近畿大農，[2]近畿大院農，[3]奈良県産振セ）

4B02-07　近畿大学構内の花から分離した酵母の遺伝的多様性解析
○松尾 啓史[1]，長谷川 哲哉[2]，笠行 康葉[2]，清水 浩美[3]，大橋 正孝[3]，都築 正男[3]，倉田 淳志[2]，上垣 浩一[2]（[1]近大院農，[2]近大農，[3]奈良県産振セ）

4B02-08　花酵母を元にした酢酸イソアミル高生産酵母の単離と分析
○高木 敬信[1]，笠行 康葉[2]，古家 美紀[2]，大橋 正孝[3]，清水 浩美[3]，倉田 淳志[2]，上垣 浩一[2]（[1]近大院農，[2]近大農，[3]奈良産業振興総合センター）

4B02-09　椿の枝から分離した野生酵母のビール醸造への利用を目指した特性分析
○中村 日向子，関 淑楓，工藤 泰良，山本 歩（八戸工業高等専門学校）

4B02-10　群馬 KAZE 酵母のカナバニン感受性が抑えられている要因についての調査
○渡部 貴志[1]，栁澤 昌臣[1]，佐藤 勝也[2]，大野 豊[2]，田島 創[1]，吉野 功[1]（[1]群技セ，[2]量研）

4B02-11　Insertion-Sequencing 解析により網羅的に同定されたビフィズス菌遺伝子の通常飼育マウス腸内における定着と生存への寄与の評価
○井上 太貴，横田 篤，吹谷 智（北大院農）

4B02-12　遺伝子欠損株を用いた *Bifidobacterium longum* 105-A の逆流硫黄経路に関与する酵素遺伝子の同定
○宮森 那知[1]，松本 菜々恵[1]，吹谷 智[1]，横田 篤[1]，和田 大[2]（[1]北大院農，[2]摂南大農）

4B02-13　環境中を伝播する新規 IncP-1 群様プラスミドの取得とその分布
○金子 健成[1]，中道 孝一朗[1]，森内 良太[2]，道羅 英夫[2]，金原 和秀[1]，新谷 政己[1,2]（[1]静大院・総合科技，[2]静大・グリーン研）

4B02-14　IncP-1 群プラスミドのα，βサブグループにおける接合伝達性の変化に関与する因子の探索
○岩田 和樹[1]，金原 和秀[1]，新谷 政己[1,2]（[1]静大院・総合科技，[2]静大・グリーン研）

4B02-15　IncP-1 群プラスミドにおける *trbO* 遺伝子の機能解析
○山田 亮[1]，金原 和秀[1]，新谷 政己[1,2]（[1]静大院総合科技，[2]静大・グリーン研）

ミーティングルームB 質疑応答コアタイム 10:30～11:00

微生物―物質生産 - 酵素，タンパク質 / 遺伝子 - 構造，機能 / 細胞 - 複合微生物，共生微生物，難培養性微生物―

4B04-01　枯草菌宿主でのフラボノイドで誘導可能なハイブリッド型タンパク質高発現系の開発
藤田 紘人，萩原 利幸，○広岡 和丈（福山大生命工・生物工）

4B04-02　糸状菌 *Aspergillus nidulans* が生産するペクチン酸リアーゼ AnPL9 の機能解析
○森島 俊輝，伊東 昂希，酒井 杏匠，志水 元亨，加藤 雅士（名城大農）

4B04-03　*Aspergillus nidulans* 由来新規ラムノガラクツロナンリアーゼの機能解析
○伊東 昂希[1]，鈴木 裕満[1]，鈴木 健吾[1]，酒井 杏匠[1]，高須賀 太一[2]，堀 千明[3]，加藤 雅士[1]，志水 元亨[1]（[1]名城大農，[2]北大農，[3]北大工）

4B04-04　鰹節カビ *Aspergillus* 属糸状菌が生産する脂質分解酵素の特性解析
小川 千晶[1]，上村 真理子[1]，木村 行宏[1]，横田 仁子[2]，土居 幹治[2]，○竹中 慎治[1]（[1]神戸大院農，[2]マルトモ(株)）

4B04-05　高グルタチオン生産出芽酵母株におけるトランスグルタミナーゼの生産
○原 陽子，油井 美優，原 清敬（静岡県立大学食品栄養科学部）

4B04-06　スギヒラタケ由来レクチンに関する生化学的研究
○中村 瑠奈[1]，稲吉 里美[2]，手塚 裕紀[1]，崔 宰熏[2,3]，道羅 英夫[3]，笹浪 知宏[2]，平井 浩文[2,3]，河岸 洋和[2,3]，鈴木 智大[1]（[1]宇都宮大・バイオ，[2]静岡大・農，[3]静岡大・グリーン研）

4B04-07　希少放線菌 *Actinoplanes missouriensis* における胞子成熟に関わる細胞壁分解酵素遺伝子 *asmA* の機能解析
○譚 鋳文[1]，手塚 武揚[1,2]，大西 康夫[1,2]（[1]東大院・農生科・応生工，[2]東大・微生物連携機構）

4B04-08　日本各地から取得した自己伝達性 IncPromA 群プラスミドの特徴の解明
○山本 雪絵[1]，金子 健成[1]，中道 孝一朗[1]，早川 雅也[1]，森内 良太[2]，道羅 英夫[2]，金原 和秀[1]，新谷 政己[1,2]（[1]静大院・総合科技，[2]静大・グリーン研）

4B04-09　IncPromA 群に属するプラスミドの異なる温度条件下での挙動の比較
○千葉 怜碧[1]，徳田 真穂[1]，雪 真弘[2]，大熊 盛也[2]，金原 和秀[1]，新谷 政己[1,2,3]（[1]静大院・総合科技，[2]理研・BRC-JCM，[3]静大・グリーン研）

4B04-10　*Methylobacterium aquaticum* 22A 株におけるメタノール走化性の分子メカニズムの解明
○菊池 志保[1]，藤谷 良子[1]，加藤 純一[2]，谷 明生[1]　([1]岡山大植物研，[2]広島大院)

4B04-11　*Mycobacterium smegmatis* 由来 PzaA の酵素学的特性と発現制御機構の解析
○栄山 新[1]，薩仁朝格吐[1]，老沼 研一[1,2]，金子 幸弘[1,2]　([1]大阪市大院医・細菌，[2]大阪市大院医・感染科学研セ)

4B04-12　放線菌にコブ状形態を誘導するピロガロールの解析
○加藤 愛美，浅水 俊平，尾仲 宏康　(東大院農生科)

4B04-13　食用藍藻スピルリナが生産する細胞外高分子物質に関する研究
○坂巻 裕[1]，前田 海成[1]，兼崎 友[2]，大森 正之[3]，朝井 計[1]，渡辺 智[1]　([1]東京農大院・バイオ，[2]静岡大学・グリーン研，[3]東京大学)

4B04-14　腸管組織内共生細菌由来のシトクロム c による宿主樹状細胞のアポトーシス誘導機構
○柴田 納央子[1,2]，國澤 純[1,2,3,4,5]，安藤 正弘[1]，細川 正人[6]，堀井 俊平[7,8]，細見 晃司[3]，竹山 春子[1,6,7,8]，清野 宏[2,9,10]　([1]早大ナノライフ創新研，[2]東大国際粘膜ワクチン開発研究セ，[3]医薬健栄研ワクチン・アジュバント研究セ，[4]阪大院医学・薬学・歯学，[5]神戸大院医学，[6]早大先進生命動態研，[7]早大院先進理工，[8]産総研 CBBD-OIL，[9]UCSD医学，[10]千葉大院医学)

4B04-15　ヒト腸内優占 *Bacteroides* 属細菌による動物宿主グリコサミノグリカン由来不飽和ウロン酸の代謝
○高瀬 隆一，幸田 有希渚，渡辺 大輔，橋本 渉　(京大院農)

4B04-16　*Bifidobacterium bifidum* のマウス経口投与による糞便中ムチン糖鎖の分解
○加藤 紀彦，後藤 愛那，荒井 萌，片山 高嶺　(京大院生命)

ミーティングルーム C　質疑応答コアタイム 9:00～9:30

微生物―細胞 - 構造，オルガネラ，小胞，分泌，細胞構成分子 / 物質生産 - 醸造，発酵（一次代謝産物）/ 物質生産 - 微生物変換，微生物酵素反応―

4C01-01　枯草菌における Spo0A 依存的な membrane vesicle 生産
○安部 公博[1]，豊福 雅典[1,2]，野村 暢彦[1,2]，尾花 望[2,3]　([1]筑波大生命環境，[2]筑波大微生物サステイナビリティ研究センター，[3]筑波大トランスボーダー 医学研究センター)

4C01-02　*Streptococcus mutans* におけるクォラムセンシングを介した MV 産生メカニズムの解明
○山本 千佳[1]，永沢 亮[1]，尾花 望[2,3]，野村 暢彦[3,4]，豊福 雅典[3,4]　([1]筑波大院・生命環境，[2]筑波大・医学医療系・TMRC，[3]筑波大・MiCS，[4]筑波大・生命環境系)

4C01-03　同属細菌間ゲノム比較とランダム変異解析による膜小胞過剰形成の機構解明
○中道 菜緒[1]，森内 良太[2]，道羅 英夫[2]，二又 裕之[1,2]，田代 陽介[1,3]　([1]静大院総合科技，[2]静大グリーン研，[3]JSTさきがけ)

4C01-04　*Penicillium chrysogenum* の細胞外膜小胞における抗菌活性の検討
○三上 力輝[1,2]，岩橋 由佳[3]，二宮 章洋[2]，古屋 俊樹[1]，浦山 俊一[2,4]，萩原 大祐[2,4]　([1]東京理科大・理工，[2]筑波大・生命環境，[3]筑波大・生命地球，[4]筑波大・MiCS)

4C01-05　酵母 *Yarrowia lipolytica* の n- アルカン代謝におけるオキシステロール結合タンパク質ホモログ Osh3 の機能解析
○何 智勇[1]，岩間 亮[1,2]，堀内 裕之[1,2]，福田 良一[1,2]　([1]東農大，[2]東大・微生物連携機構)

4C01-06　酵母のタンパク質品質管理におけるエタノール耐性獲得と酒類醸造過程での挙動
○吉田 雅偲[1]，古谷 昇[1]，藤原 久志[2]，若井 芳則[2]，井澤 真吾[1]　([1]京工繊大院・応用生物，[2]黄桜株式会社)

4C01-07　分岐鎖アミノ酸アミノ基転移酵素 Bat1 のアミノ酸置換（Ala234Asp）が酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の生理機能に及ぼす影響
○豊川 洋一[1]，Koonthongkaew Jirasin[1]，大橋 正孝[2]，Large Christopher[3]，Dunham Maitreya[3]，高木 博史[1]　([1]奈良先端大，[2]奈良県産振セ，[3]ワシントン大)

4C01-08　スレオニン脱アミノ化酵素 Ilv1 の新規変異体がイソロイシン生産と清酒醸造特性に与える影響
○磯貝 章太[1]，小高 敦史[2]，村上 直之[2]，蘆田 佳子[1]，堀田 夏紀[2]，松村 憲吾[2]，西村 明[1]，秦 洋二[2]，石田 博樹[2]，高木 博史[1]　([1]奈良先端大・バイオ，[2]月桂冠・総研)

4C01-09　味噌・醤油酵母 *Zygosaccharomyces* sp. の接合制御
○尾形 智夫，黒木 克明　(前橋工科大学大学院)

4C01-10　味噌・醤油酵母 *Zygosaccharomyces* sp. の接合性特異的遺伝子の発現制御
○福田 萌々花，黒木 克明，尾形 智夫　(前橋工科大)

4C01-11　電気制御発酵に向けた Shewanella oneidensis MR-1 株の電子受容能力の向上
○田中 勇吾[1]，富岡 優樹[1]，鈴木 志野[2]，石井 俊一[3]，高妻 篤史[1]，渡邉 一哉[1]　([1]東薬大生命，[2]国立研究開発法人宇宙航空研究開発機構，[3]国立研究開発法人海洋開発機構)

4C01-12　組換鉄酸化細菌の電気培養による CO_2 由来エチレン生成効率化の検討
○中村 孝道[1]，谷口 惠梨[1]，平野 伸一[2]　([1]熊谷組技研，[2]電中研環境)

4C01-13　細胞膜結合型 D- マンノース異性化酵素の発見と異性化糖の新しい製造法
○足立 収生，片岡 尚也，松下 一信，赤壁 善彦，薬師 寿治　(山口大農)

4C01-14　バイオ電池を外部 エネルギー源としたリンゴ酸酵素逆反応による 炭酸固定化システム
○上床 翔太郎，大田 竹留，髙村 映一郎，坂元 博昭，里村 武範，末 信一朗　(福井大工)

ミーティングルーム C　質疑応答コアタイム 10:00～10:30

微生物―細胞 - 複合微生物，共生微生物，難培養性微生物 / 遺伝子 - 発現制御，トランスクリプトーム / 物質生産 - 発酵（二次代謝産物，抗生物質，ペプチド，生理活性物質）―

4C03-01　マイクロ流体デバイスによる微小環境を制御した人工細菌凝集体の開発
○野村 佳祐[1]，高橋 晃平[2]，小川 和義[3]，豊福 雅典[3,4]，野村 暢彦[3,4]，Utada Andrew[3,4]　([1]筑波大・生命環境，[2]筑波大院・生命環境，[3]筑波大・生命環境系，[4]筑波大・MiCS)

4C03-02　皮膚細菌が形成するバイオフィルムの時空間的解析
○中山 瑞鵬[1]，釣流 香織[2]，Li Xiaojie[2]，野村 暢彦[3,4]，尾花 望[5]，アンドリュー ウタダ[3,4]　([1]筑波大生命環境，[2]筑波大学院生命環境，[3]筑波大生命環境系，[4]筑波大MiCS，[5]筑波大医学医療系 TMRC)

4C03-03　山廃酒母由来 *Lactobacillus plantarum* LP-2 株と清酒酵母間の共凝集とバイオフィルム形成
○藤原 久志，若井 芳則　(黄桜株式会社)

4C03-04　Cellular dynamics upon cell fusion in the co-culture between compatible/incompatible strains in the industrial filamentous fungus *Aspergillus oryzae*
○LU Chan[1]，MORI Noriko[1]，KATAYAMA Takuya[1,2]，SAITO Ryota[3]，IWASHITA Kazuhiro[3]，MARUYAMA Jun-ichi[1,2]　([1]Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo，[2]CRIIM, UTokyo，[3]NRIB)

4C03-05　グラム陽性細菌の接合プラスミド pLS20 の接合伝達ダイナミクス
○森 光太郎[1]，Valeria Verrone[2]，石川 周[1]，Anil Wipat[2]，吉田 健一[1]　([1]神戸大イノベ，[2]ニューキャッスル大学)

4C03-06　黄麹菌 *Aspergillus oryzae* の転写因子 PrtR の解析
○田中 優花子，西岡 佐和子，辻 僚太郎，山形 洋平 （東京農工大農）

4C03-07　土壌細菌 *Burkholderia multivorans* における転写制御因子 IscR の解析
○野々山 翔太[1]，岸田 康平[2]，酒井 啓一郎[1]，永田 裕二[1]，津田 雅孝[1]，大坪 嘉行[1] （[1]東北大院生命科学，[2]テキサス大学マクガバンメディカルスクール）

4C03-08　大腸菌とサルモネラの *glnA* 3′ UTR による SucA の転写後調節
○宮腰 昌利 （筑波大医）

4C03-09　*Komagataella phaffii* Snf1 のメタノール誘導性遺伝子発現における役割
○岡本 大樹，井上 紘一，由里本 博也，阪井 康能 （京大院農）

4C03-10　放線菌 *Streptomyces coelicolor* A3(2)におけるヘムを基盤とした NO 依存性二成分制御系による抗生物質生産調節メカニズム
○本間 颯太，伊藤 晋作，矢嶋 俊介，佐々木 康幸 （東農大院農）

4C03-11　RNA-seq 解析に基づいた複合培養における二次代謝活性化機構の解析
○木田 優士，浅水 俊平，尾仲 宏康 （東大院・農生科）

4C03-12　複合培養における *Streptomyces coelicolor* の RED 生産遅延に関与する TetR 型転写制御因子の解析
○LEI YUKUN[1]，浅水 俊平[1]，石塚 匠[1]，柳澤 昌臣[1]，大野 豊[2]，佐藤 勝也[2]，尾仲 宏康[1] （[1]東大農，[2]量研機構）

4C03-13　ゴードスポリンが *Streptomyces lividans* の生産するタンパク質及び生育，二次代謝に与える影響
○河野 佐知子，浅水 俊平，尾仲 宏康 （東大院農生科）

4C03-14　放線菌 *Streptomyces lavendulae* FRI-5 株由来休眠遺伝子の強制発現による 新規化合物の発掘
○池阪 昂平，小椋 康平，Ivy Grace Umadhay Pait，本田 孝祐，仁平 卓也，木谷 茂 （阪大・生物工学国際交流センター）

4C03-15　オフロキサシンを活用した放線菌の二次代謝活性化
○星野 颯[1,2]，谷津 穂高[3]，濱渦 亮子[1]，保坂 毅[1,2,3] （[1]信州大・バイオメディカル研，[2]信州大・総合医理工，[3]信州大・農）

4C03-16　糸状菌リボソームペプチド前駆体ペプチドにおける繰り返し構造の役割
○梅村 舞子[1]，栗岩 薫[1]，玉野 孝一[1,2]，河原林 裕[1] （[1]産業技術総合研究所生物プロセス研究部門，[2]産業技術総合研究所生体システムビッグデータ解析オープンイノベーションラボラトリ）

ミーティングルームD 質疑応答コアタイム 9:30～10:00

食品―食品機能・栄養 - 消化・吸収，循環・血管 / 食品機能・栄養 - その他 / 食品機能・栄養 - 酸化，抗酸化，糖化，抗糖化，老化 / 食品機能・栄養 - 神経，内分泌，味覚・食欲―

4D02-01　ゴマ由来アンジオテンシン I 変換酵素（ACE I）阻害ペプチドの探索および機能解析
○野村 亮[1]，都築 翔[1]，寺西 弘志[2]，山本 正次[2]，上前 健太朗[2]，志水 元亨[1]，加藤 雅士[1] （[1]名城大農，[2]KISCO 株式会社）

4D02-02　アサイー果実抽出物は腎低酸素化を介して造血因子 erythropoietin を増加する
○澁谷 修一[1]，戸田 年彦[2]，渡辺 憲史[1]，Jose Villegas Yata Mario[3]，清水 孝彦[1,2] （[1]国立長寿医療研究セ・老化ストレス応答，[2]千葉大院医・内分泌代謝・血液・老年内科学，[3]株式会社フルッタフルッタ）

4D02-03　ラットにおけるブラジル産グリーンプロポリス由来桂皮酸誘導体の代謝
○山家 雅之[1,2]，谷 央子[1]，室田 佳恵子[2,3] （[1]株式会社山田養蜂場みつばち健康科学研究所，[2]鳥取大学大学院連合農学研究科　生命資源科学専攻　資源利用化学講座，[3]島根大学　生物資源科学部　生命科学科）

4D02-04　安定同位体標識による 1- デオキシノジリマイシンの吸収・排泄と臓器移行の評価
○高須 蒼生[1]，パリダ イザベラ スパルディ[1]，田中 福代[2]，山岸 賢治[3]，伊藤 隼哉[1]，木村 俊之[3]，仲川 清隆[1] （[1]東北大院農・機能分子解析学，[2]農研機構中央農業研究センター，[3]農研機構食品研究部門）

4D02-05　レジスタントスターチ（RS2a）摂取が便秘の訴えを有する女性の排便状態と腸内フローラに及ぼす影響
○永井 成美，久保 歩美，黒田 佳澄，末継 夏帆，鈴木 新，飯田 晃生，高山 祐美，湯面 百希奈 （兵庫県立大栄養）

4D02-06　アボカド果実からのアクロレイン消去成分の精製
○酒井 杏子，田村 奈津美，真野 純一 （山口大農）

4D02-07　異物代謝酵素発現酵母を用いたスチルベノイド抱合代謝物の網羅的合成
○中山 舞，西川 美宇，深谷 圭介，占部 大介，榊 利之，生城 真一 （富山県大院工）

4D02-08　ファイトケミカルの継続処理による細胞のストレス耐性の変動
○河口 詩歩，石坂 朱里，村上 明 （兵庫県大・環境人間）

4D02-09　品種改良ケールから単離したエクソソーム様ナノ粒子のコラーゲン産生促進作用
○小池 えみり[1]，上條 友梨子[2]，市川 紗貴[2]，スパッタ チャワリットポン[2]，大野 智弘[3]，中村 宗一郎[2]，片山 茂[1,2,4] （[1]信州大農，[2]信州大院・農，[3]ヤクルトヘルスフーズ，[4]信州大・バイオメディカル研）

4D02-10　フラバンジェノールは皮膚で TERT を強制発現させ，発毛を促進する
○小川 瑞紀[1]，森川 琢海[2]，髙野 晃[2]，神谷 智康[2]，髙垣 欣也[2]，片倉 喜範[1] （[1]九州大生資環，[2]株式会社東洋新薬）

4D02-11　老化による生理機能の変化に対するα - グリセロホスホコリン摂取効果の検討
○成川 真隆[1,2]，上吉原 絢[1]，伊豆 英恵[3]，藤井 力[3,4]，松原 主典[5]，三坂 巧[1] （[1]東大院農生科，[2]京都女子大家政，[3]酒総研，[4]福島大食農，[5]広島大院人社科）

4D02-12　抗酸化作用をもつ真珠層多糖の記憶障害改善作用
○若生 真由美，山上 光，長谷川 靖 （室蘭工業大学）

4D02-13　乳由来βラクトリンの頭頂葉領域の神経活動活性化による注意集中力向上
○金留 理奈[1]，阿野 泰久[1]，品川 和志[2]，井出 弓子[3]，柴田 みどり[2]，梅田 聡[2] （[1]キリンホールディングス株式会社，[2]慶應大，[3]東京センタークリニック）

4D02-14　脳虚血モデルラットにおけるエステル型オキシリピンの解析とその機能解明
○乙木 百合香[1,2]，加藤 俊治[1]，仲川 清隆[1]，Ameer Taha[2] （[1]東北大農，[2]カリフォルニア大学デービス校）

4D02-15　ビタミン C 欠乏ラットのビタミン C 摂取行動には味覚が関与する
○沼上 真佑[1]，竹名 麻子[2] （[1]明治大院農，[2]明治大農）

ミーティングルームD 質疑応答コアタイム 10:30～11:00

食品―食品機能・栄養 - 消化・吸収，循環・血管 / 食品機能・栄養 - 神経，内分泌，味覚・食欲 / 食品機能・栄養 - アレルギー・アレルゲン―

4D04-01　血管異常収縮を予防する桑葉の特性解析
○鶴留 奈津子，南 雄二，加治屋 勝子 （鹿児島大院連農）

4D04-02　血液試料における quercetin 及び代謝物の定量方法
○佐藤 衣織，横田 しなの，村留 梨花，村上 明，石坂 朱里 （兵庫県大・環境人間）

4D04-03　非哺乳類型長鎖塩基のリンパ液への吸収
○三上 大輔[1]，酒井 祥太[4]，湯山 耕平[1]，西向 めぐみ[3]，向井 克之[2]，五十嵐 靖之[1] （[1]北大院先端生命，[2]ダイセル，[3]岩手大農，[4]国立感染研）

4D04-04　カテキン重合物の侵害受容器を介した循環刺激作用の解明
○伏見 太希，越野 秀啓，小林 紗子，花城 翔詠，井上 綾乃，藤井 靖之，須原 義智，越阪部 奈緒美　（芝工大理工）

4D04-05　ガラクトース摂取による尿中グルコース排出促進作用に対する SGLT2 の関与の解明
○佐藤 洸希，大川 咲希，大崎 雄介，駒井 三千夫，白川 仁　（東北大・院農・栄養学）

4D04-06　黒ショウガ（*Kaempferia parviflora*）による脳認知機能改善効果の可能性
○吉田 泉[1]，吉田 香[2]，高橋 有志[1]，藤田 和弘[1]，五十嵐 友二[1]（[1]日本食品分析セ，[2]同志社女大）

4D04-07　社会的敗北ストレスマウスに対するカテキンオリゴマーの行動薬理学的検証
○藤井 靖之[1]，伏見 太希[1]，坂田 純[1]，松永 祥孟[1]，平 修[2]，越阪部 奈緒美[1]（[1]芝浦工大，[2]福島大食農）

4D04-08　カテキン重合物の覚醒作用に関する検討
○坂田 純，藤井 靖之，佐藤 史隆，牟田 織江，伏見 太希，越阪部 奈緒美　（芝工大）

4D04-09　ロスマリン酸による Neuro-2a 細胞の JNK/STAT3 シグナル伝達経路の活性化を介した神経突起伸長作用の解明
○富岡 拓磨[1]，石井 剛志[2]，赤川 貢[1]（[1]大阪府大院・生命環境，[2]神戸学院大院・栄養）

4D04-10　苦味細胞における転写因子 Eya1 の発現
○應本 真[1]，北本 颯希[2]，廣田 順二[1,2]（[1]東工大バイオセンター，[2]東工大生命理工）

4D04-11　ヒト苦味受容体 hT2R14 の結晶構造解析に向けた試み
○山出谷 拓海[1]，壇 淳[1]，水谷 公彦[1]，三上 文三[2]，林 由佳子[1]（[1]京大院農，[2]京大生存研）

4D04-12　IgE ノックインマウスを用いたアレルギー性腸炎モデルのメタボローム解析
Zubeldia-Varela Elisa[1]，Blanco-Perez Frank[2]，○大澤 ひかり[3]，Villasenor Alma[1]，高橋 恭子[4]，Barber Domingo[1]，Vieths Stefan[2]，Perez-Gordo Marina[1]，Barbas Coral[1]，戸田 雅子[3]（[1]Universidad San Pablo-CEU, CEU Univ.，[2]Paul-Ehrlich-Institut，[3]東北大農，[4]日大生物資源科学）

4D04-13　*Lactobacillus plantarum* 22A-3 の抗アレルギー効果と腸管免疫系への影響
○榎田 麻里[1]，大戸 信明[2]，桒原 浩誠[2]，水野 雅史[1]（[1]神戸大院農，[2]丸善製薬株式会社）

4D04-14　アレルギーモデルマウスにおける 4,8- スフィンガジエニン立体異性体の抗アレルギー活性
○清水 遥河[1]，中村 逸揮[1]，久世 雅樹[1]，大戸 信明[2]，桒原 浩誠[2]，水野 雅史[1]（[1]神戸大院農，[2]丸善製薬株式会社）

4D04-15　煮干し酵素分解エキスの脱顆粒抑制効果に関する研究
○平川 泰己，西 甲介，石田 萌子，菅原 卓也　（愛媛大院農）

ミーティングルーム E 質疑応答コアタイム 9:00～9:30

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

4E01-01　新規食品機能性成分ナス由来コリンエステル（アセチルコリン）の血圧改善効果と抗高血圧作用メカニズム
○山口 翔平[1]，早坂 柚実[2]，鈴木 美穂[2]，小山 正浩[3]，椿 和文[4]，西村 三恵[5]，西平 順[5]，中村 浩蔵[1,2,6]（[1]信州大院総合医理工，[2]信州大院総合理工，[3]株式会社ウェルナス，[4]株式会社ADEKA，[5]北海道情報大学，[6]信州大農）

4E01-02　新規食品機能性成分ナス由来コリンエステル（アセチルコリン）を関与成分とした世界初のナス機能性表示サプリメント
○小山 正浩[1]，鈴木 美穂[2]，野澤 周吾[2]，山口 翔平[3]，椿 和文[4]，中村 浩蔵[2,3,5]（[1]株式会社ウェルナス，[2]信州大院総合理工，[3]信州大院総合医理工，[4]株式会社ADEKA，[5]信州大農）

4E01-03　システマティックレビューによるナス由来コリンエステル（アセチルコリン）を関与成分とした機能性表示生鮮ナスおよびナス漬物の開発
中村 浩蔵[1,3,4]，○小山 正浩[2]，鈴木 美穂[3]，野澤 周吾[3]，山口 翔平[4]，冨田 邦彦[5]，豊永 明男[6]（[1]信州大農，[2]株式会社ウェルナス，[3]信州大院総合理工，[4]信州大院総合医理工，[5]三井食品工業株式会社，[6]高知県農業協同組合）

4E01-04　腸管におけるオレアミドの吸収機構
○小林 恭之[1]，渡辺 夏美[1]，杉本 圭一郎[2,3]，室田 佳恵子[4]，甲斐 建次[1]，原田 直樹[1]，乾 博[5]，山地 亮一[1]（[1]大阪府・大学院・生命環境，[2]長岡香料，[3]大阪府大・生資セ，[4]島根大・生物資源，[5]大阪府大・栄養）

4E01-05　シソ科植物に含まれるロスマリン酸とその代謝物のマウスにおける体内分布
○小松澤 里帆[1]，平 修[2]，岡田 憲典[3]，阿部 啓子[1,4]，山田 正仁[5]，小林 彰子[1]（[1]東大院農，[2]福大農，[3]東大生セ，[4]産技総研，[5]金沢大院医）

4E01-06　活性酸素に応答し，抗酸化物質を放出するグルカンナノキャリアー
○土居 菜々子，甲元 一也　（甲南大FIRST）

4E01-07　メルローワインおよびその残渣に含まれる成分のアンチエイジング効果
○田中 文人[1]，澤邊 昭義[1]，山盛 拓馬[1]，竹田 竜嗣[2]，岸本 賢治[3]（[1]近畿大農，[2]関西福祉科学大健康福祉，[3]株式会社ハーベリィアーストーリー）

4E01-08　カルボニルストレスが腎うっ血により惹起される腎障害に与える影響の解析
○大崎 雄介[1]，高橋 知香[2]，伊藤 貞嘉[3]，白川 仁[1]，森 建文[2]（[1]東北大・院農・栄養学，[2]東北医科薬科・腎内，[3]東北大・院医・腎高内）

4E01-09　スダチ果皮エキスの皮膚角化細胞における抗酸化遺伝子への影響
○植野 実佐子[1]，安部 庄剛[2]，下田 毬絵[3]，金岡 大樹[3]，山﨑 博子[3]，湯浅 恵造[1,2]（[1]徳島大院創成科学，[2]徳島大院先端技術，[3]松山油脂(株)）

4E01-10　Plant-derived peptides that affect the glycation of human serum albumin
○Lyu Yi[1]，Ozawa Tomoya[1]，Zhang Mimin[1]，Lu Peng[1]，Okamoto Ken[1]，Itoh Hideaki[1]，Suzuki Michio[1]，Hanada Kousuke[2]，Nakasone Hikaru[3]，Kondo Satoshi[3]，Yonekura Madoka[3]，Nagata Koji[1]（[1]The University of Tokyo，[2]Kyusyu Institute of Technology，[3]Toyota Motor Corporation）

4E01-11　Myricetin の認知機能低下抑制作用とそのメカニズム
○島田 優，佐藤 由佳，熊添 基文，藤村 由紀，立花 宏文　（九大院農院・生機科）

4E01-12　官能評価値をオトガイ舌骨筋の表面筋電位を用いて可視化する
○森 安珠[1]，上田 玲子[1]，朝倉 富子[1]，阿部 啓子[1,2]（[1]東京大学大学院　農学生命科学研究科　応用生命化学専攻，[2]神奈川県立産業技術総合研究所）

4E01-13　食事誘導性肥満ラットにおける消化管部位別の GLP-1 分泌応答と組織解析
○佐野 杏莉，比良 徹　（北海道大学農）

4E01-14　食用酵素によるカゼイン分解物からのオピオイドペプチドの単離と性質
○竹内 柚衣，福永 もえ，宮永 一彦，岩谷 駿，山本 直之　（東工大）

4E01-15　ダイダイ精油とタッチケアへの応用
○桜井 和俊[1]，玉井 英子[1]，益田 葉子[1]，浦上 研一[1]，楠原 正俊[2]（[1]静ガン，[2]NTT 東伊豆病院）

ミーティングルームE 質疑応答コアタイム 10:00～10:30

食品―食品機能・栄養 - 消化・吸収，循環・血管 / 食品機能・栄養 - 神経，内分泌，味覚・食欲 / 食品機能・栄養 - アレルギー・アレルゲン―

4E03-01　質量分析計を用いたレスベラトロール構造異性体の硫酸化代謝物解析
○中野 悠[1]，黒木 勝久[1]，ミンチェン リウ[2]，水光 正仁[1]，榊原 陽一[1]（[1]宮崎大農，[2]トレド大薬）

4E03-02　アピゲニンアグリコンおよび配糖体の腸管吸収における輸送経路の解明
○川本 実佳，室田 佳恵子（島根大生物資源）

4E03-03　糖質分解酵素阻害活性を有する東播磨地域産農作物のスクリーニング
○栗山 磯子，山﨑 一諒，細川 敬三（兵庫大・健康科学）

4E03-04　ヒマワリの脱脂種子の活用を目指した生体調節機能の探索
○佐藤 咲希[1]，川添 華菜[1]，南 雄二[1,2]，加治屋 勝子[1,2]（[1]鹿児島大学大学院農林水産学研究科，[2]鹿児島大学農学部食料生命科学科）

4E03-05　資源循環の取り組みから生まれたオイルの血管への作用
○川添 華菜[1]，佐藤 咲希[1]，南 雄二[1,2]，加治屋 勝子[1,2]（[1]鹿児島大学大学院農林水産学研究科，[2]鹿児島大学農学部食料生命科学科）

4E03-06　α-トコトリエノールのステロドホルモン分泌促進活性における標的タンパク質の解析
○長世 智朗，寺田 直史，加藤 英介（北大院農）

4E03-07　脳腸相関を活性化するホップ苦味酸摂取による注意機能およびストレス状態の改善
○福田 隆文[1]，大沼 徹[2]，近藤 澄夫[3]，新井 平伊[2]，阿野 泰久[1]（[1]キリン中央研，[2]順大医，[3]福島健康管理センター）

4E03-08　高い応答性を有するhT1R1/hT1R3安定発現細胞株作出の試み
○木寺 優太，竹谷 千晶，三坂 巧（東大院農生科・応生化）

4E03-09　メチオノール構造類縁体の嗜好味受容体活性調節能の検討
○五十嵐 晶帆，鈴木 あゆ，三坂 巧（東京院農生科・応生化）

4E03-10　霊長類旨味受容体の機能と食性の関わりの解明
○戸田 安香[1]，早川 卓志[2]，栗原 洋介[3]，中北 智哉[4]，河村 正二[5]，今井 啓雄[6]，石丸 喜朗[1]，三坂 巧[7]（[1]明大農・農芸化，[2]北大院地球環境・環境生物，[3]静大・農，[4]愛大・PROS，[5]東大院新領域・先端生命，[6]京大霊長類研・ゲノム細胞，[7]東大院農生科・応生化）

4E03-11　高温高圧水処理による低アレルゲン化食品素材の調製
○尾近 和信[1]，長田 光正[2]，服部 誠[1]，好田 正[1]（[1]東農工大，[2]信大繊維）

4E03-12　花粉関連食物アレルギー症候群における gibberellin-regulated protein の交差要因の解析
○蕭 喬丹[1]，CABANOS Cerrone[1]，福冨 友馬[2]，丸山 伸之[1]（[1]京大農，[2]国立病院機構相模原病院）

4E03-13　低アレルゲン化ホエイタンパク質の経口投与による牛乳アレルギーの発症抑制
○湯澤 美沙季，橋本 啓，東 徳洋，山田 潔（宇都宮大農）

4E03-14　食品アレルギーの緩和作用を持つ食品因子の探索とそのメカニズム解析
○稲葉 亮平，服部 誠，好田 正（東農工大農）

4E03-15　実験的アレルギー性腸炎における肥満細胞の役割
○戸田 雅子[1]，Blanco Frank[2]，Gonzalez Menendez Irene[3]，Stassen Michael[4]，Quintanilla Martinez Leticia[3]，Feyerabend Thorsten[5]，Rodewald Hans Reimer[5]，Vieths Stefan[2]，Scheurer Stephan[2]（[1]東北大農，[2]Paul-Ehrlich-Institut，[3]Tubingen Univ.，[4]Mainz Univ.，[5]Heidelberg Univ.）

ミーティングルームF 質疑応答コアタイム 9:30～10:00

有機化学，天然物化学―合成，反応機構 / 天然物 - ケミカルバイオロジー / 農薬，医薬―

4F02-01　Pleurospiroketal 類の合成研究
○帯津 陽一，小倉 由資，渡邉 秀典，滝川 浩郷（東大院農）

4F02-02　推定生合成経路に基づくストリゴラクトン類の合成研究
○塩谷 七洋[1]，若林 孝俊[2]，茂田 巧[1]，小倉 由資[1]，杉本 幸裕[2]，滝川 浩郷[1]（[1]東大院農，[2]神大院農）

4F02-03　(2*S*,6*R*)-ジアミノ-(5*R*,7)-ジヒドロキシヘプタン酸(DADH)及びその誘導体の立体選択的合成
○岡村 仁則[1]，保野 陽子[1]，滝川 浩郷[2]，品田 哲郎[1]（[1]阪市大院理，[2]東大院農生科）

4F02-04　電気化学的手法を用いたベンズアルデヒドとアミンのアミド結合形成反応
○黒瀬 佑馬，今田 泰史，岡田 洋平，千葉 一裕（東農工大院）

4F02-05　Hygrophorone F および G の合成
○田中 咲妃，森口 舞子，姜 法雄，久世 雅樹（神戸大農）

4F02-06　ポリ ADP リボース分岐構造の合成
○茂﨑 恵太[1]，萩野 瑠衣[1]，河村 奈緒子[2,3]，安藤 弘宗[2,3]，田中 秀則[2,3]（[1]岐阜大・応用生物，[2]岐阜大・G-CHAIN，[3]東海国大機構・iGCORE）

4F02-07　リン酸クロスカップリング反応を鍵とした ADP リボース clickable 分子の高効率合成
○萩野 瑠衣[1]，河村 奈緒子[2,3]，安藤 弘宗[2,3]，田中 秀則[2,3]（[1]岐阜大・応用生物，[2]岐阜大・G-CHAIN，[3]東海国大機構・iGCORE）

4F02-08　共有結合型 PPARγリガンドとその類縁化合物による抗炎症活性の検証
○大前 勇馬[1]，礒田 博子[2,3]，宮前 友策[2]（[1]筑波大院・グローバル教育院，[2]筑波大・生命環境，[3]筑波大・北アフリカ）

4F02-09　生体直交型反応を示す官能基を付加した PPARγ リガンドの合成と活性評価
○安 彩伽[1]，大前 勇馬[2]，有本 光江[3]，加香 孝一郎[4]，礒田 博子[4,5]，深水 昭吉[6]，繁森 英幸[4,7]，宮前 友策[4]（[1]筑波大院生命環境，[2]筑波大院　グローバル教育院，[3]筑波大　生命環境系技術室，[4]筑波大　生命環境系，[5]筑波大　地中海・北アフリカ，[6]筑波大　TARAセ，[7]筑波大　MiCS）

4F02-10　蛍光標識化 TAK779 類縁体の合成と CCR5 結合アッセイに関する研究
○青田 太一，齋藤 拓也，横山 智哉子，今野 博行（山形大院理工）

4F02-11　ブラリナトガリネズミ由来の神経毒ペプチド BPP 類の合成研究
○矢野 佑介，Maturana Andres D.，森田 真布，北 将樹（名大院生命農）

4F02-12　防カビ剤の新規な定量法「菌糸侵入距離法」
○小田 忍，佐藤 紅空（金沢工大ゲノム研）

4F02-13　γ-BHC およびε-Heptachlorocyclohexane のメチル基置換類縁体の殺虫活性と GABA アンタゴニスト活性
○田中 啓司[1]，尾添 嘉久[2]，赤松 美紀[3]，松田 一彦[1]（[1]近畿大農，[2]島根大生物資源，[3]京都大農）

4F02-14　pH 低下による塩基性両親媒性構造の減少が抗マラリア薬耐性の原因である
○上園 幸史，北川 智久，松本 惇志，寺島 一郎（東京大学）

4F02-15　膜透過性環状ペプチドの新規スクリーニング法の有用性の検証
○井上 雄介，稲垣 穣，増田 裕一（三重大生物資源）

4F02-16　アンチセンス治療を指向した長鎖ペプチド核酸の合成研究
○村上 一馬[1]，八木田 凌太郎[1]，池田 壽文[2]，入江 一浩[1]（[1]京大農，[2]東京家政大）

ミーティングルームF 質疑応答コアタイム 10:30～11:00

有機化学，天然物化学―天然物 - ケミカルバイオロジー / 農薬，医薬 / 天然物 - 単離構造決定 - 動物，植物 / その他―

4F04-01　キューバ産植物由来抗炎症物質 jacaranone の構造活性相関および標的分子同定
○蛭川 美奈子，柴田 貴広，森田 真布，北 将樹 （名大院生命農）

4F04-02　致死性海藻中毒原因物質ポリカバノシド類の作用機序と構造活性相関
○土肥 裕花[1]，岩崎 浩太郎[2]，佐々木 理[2]，川島 悠岐[2]，島田 紀子[1]，長 由扶子[1]，此木 敬一[1]，佐々木 誠[2]，山下 まり[1]（[1]東北大院農，[2]東北大院生命科）

4F04-03　急性 T リンパ芽球性白血病由来細胞に対する特異的な増殖抑制活性を有する化合物の置換基効果
○藤田 優希[1,2]，吉田 千紘[1,2]，東 智也[1,2]，鉢呂 佳史[1,2]，中田 千尋[3,4]，八木 拓哉[3,4]，武智 あづさ[3,5]，北田 昇雄[1,2]，小畠 りか[1]，原 孝彦[3,4,5]，牧 昌次郎[1,2]（[1]電通大院・情報理工学，[2]電通大・脳医工学研究センター，[3]都医学研・幹細胞，[4]東京医歯大院・医歯学総合，[5]都立大院・幹細胞制御学）

4F04-04　Pholasin の発現と活性化
○森口 舞子，姜 法雄，久世 雅樹 （神戸大農）

4F04-05　Effect of *In Vitro* Digestion on Anti-α-amylase and Antitumor Activities of *Sargassum polycystum* Grown in Cambodia
○Un Sovannary，Nguyen Van Quan，Xuan Tran Dang（Hiroshima University）

4F04-06　イオンモビリティ MS によるフェアリー化合物の高感度分析
○謝 肖男[1]，竹原 千恵[1]，崔 宰熏[2,3,4]，呉 静[3]，菅 敏幸[5]，河岸 洋和[2,3,4]（[1]宇都宮大・バイオ，[2]静大院・創造，[3]静大・グリーン研，[4]静大院・総合農，[5]静県大・薬）

4F04-07　ヌメリツバタケモドキ培養物からのがん細胞増殖阻害物質の単離・同定
井上 裕貴，高橋 賢次，太田 利男，上野 琴巳，○石原 亨 （鳥取大農）

4F04-08　ストレプトグラミン系抗生物質エタマイシン A による抗 MRSE 活性
○小泉 幸央[1]，常盤野 哲生[2]，志村 洋一郎[2]，岩月 正人[3]，久場 敬司[1]（[1]秋田大院・医，[2]秋田県大・生資科，[3]北里大・大村研）

4F04-09　ヤーコン葉由来メランポライドの昆虫摂食阻害活性を向上させる化学構造因子
○和久田 悦生，森本 正則，行迫 海人，松田 一彦 （近畿大農）

4F04-10　インドネシア産プロポリスの起源植物に含まれる成分に関する化学的研究
○水野 さやか[1]，宮田 椋[1]，本田 沙理[1]，ムハマッド サーラン[2]，谷口 透[3]，熊澤 茂則[1]（[1]静県大食，[2]インドネシア大理工，[3]北大理学）

4F04-11　β-シトロネロール誘導体イソチオシアナート化合物の合成とフジツボキプリス幼生に対する付着阻害活性の評価
○藤原 隆也[1]，中嶋 菜摘[1]，野方 靖行[2]，吉村 えり奈[3]，千葉 一裕[1]，北野 克和[1]（[1]東農工大農，[2]電中研，[3]株式会社セレス）

4F04-12　タマネギに含まれる蛍光性フラボノイド配糖体の合成研究
○西條 祐輝，堀 優希，二瓶 賢一 （宇都宮大農）

4F04-13　対称ジヒドロフランリグナン，リベシン B の全合成と構造訂正
○堀尾 嘉恵，二瓶 賢一 （宇都宮大農）

4F04-14　ポリフェノール配糖体，ソンネルフェノリック C の化学合成と構造訂正
○島影 凌，岩舘 丈央，二瓶 賢一 （宇都宮大農）

4F04-15　スギヒラタケから単離された異常アミノ酸誘導体の全合成とその立体化学
○モウ ウェン ジ[1]，鈴木 智大[2]，河岸 洋和[3]，二瓶 賢一[1]（[1]宇都宮大農，[2]宇都宮大バイオ，[3]静岡大農）

4F04-16　スチリルクマリン類の合成及び構造活性相関に関する研究
○増本 壮一郎[1]，川井 悟[1]，常盤野 哲生[2]，吉澤 結子[2]（[1]東京電機大学，[2]秋田県立大学）

4F04-17　ジベンゾイルメタンの合成と生物活性について
○中間 都海[1]，川井 悟[1]，常盤野 哲生[2]，吉澤 結子[2]（[1]東京電機大学，[2]秋田県立大学）

ミーティングルームG 質疑応答コアタイム 9:00～9:30

生物科学―糖鎖科学 - 構造，機能，糖鎖工学，その他 / 生物工学 - 解析技術・方法論，その他 / その他―

4G01-01　ポリシアル酸転移酵素 ST8SIA2 と ST8SIA4 が合成するポリシアル酸の構造と性質
○森 愛理[1,2,3]，羽根 正弥[1,2,3]，北島 健[1,2,3]，佐藤 ちひろ[1,2,3]（[1]名大院・生命農学，[2]名大・生物機能セ，[3]iGCORE）

4G01-02　サナギタケ由来レクチン（CmLec4）の諸性質決定とその結合タンパク質の糖鎖解析
○小野 晶子[1]，佐藤 千裕[1]，鈴木 稔之[1]，崔 宰熏[2,3]，尾形 慎[4]，平井 浩文[3]，道羅 英夫[3]，河岸 洋和[2,3]，鈴木 智大[1]（[1]宇都宮大・バイオ，[2]静岡大・農，[3]静岡大・グリーン研，[4]福島大・農）

4G01-03　グリコマクロペプチドを介したビフィズス菌間のクロスフィーディング効果
○両角 麻衣，和田 泰明，江原 達弥，和泉 裕久，中村 浩彦，宮地 一裕 （森永乳業株式会社　健康栄養科学研究所）

4G01-04　糖修飾シリカゲルを用いた分子センシングに関する研究
○内田 司[1]，中村 彩乃[2]，蟹江 善美[3]，蟹江 治[1,2]（[1]東海大　院工，[2]東海大　工，[3]東海大　技）

4G01-05　多分岐糖鎖をもつ抗体の調製と機能解析
○高島 晶，黒河内 政樹，月村 亘，森 昌子，大隈 賢二，菅原 州一，天野 純子，水野 真盛，高田 美生，松田 昭生 （(公財)野口研）

4G01-06　ウシの消化管と軟骨組織に含まれるグリコサミノグリカンの組成分析
○武田-奥田 尚子，田村 純一 （鳥取大農）

4G01-07　動物組織に含まれるコンドロイチン硫酸 / デルマタン硫酸の分子量
○田村 純一，九里 幸汰，武田-奥田 尚子 （鳥取大農）

4G01-08　マトリグリカンの合成～ Xyl-GlcA 二糖のオリゴマー化～
○田村 敬裕[1]，大村 優華[2]，田村 純一[1,2]（[1]鳥取大院・連大農，[2]鳥取大院・農）

4G01-09　*Schizosaccharomyces pombe* における推定α-ガラクトース転移酵素 10 遺伝子の機能解析
○福永 嵩大[1]，田中 直孝[2]，古本 敏夫[2]，中北 愼一[3]，大橋 貴生[4]，樋口 裕次郎[1]，前川 裕美[1]，竹川 薫[1]（[1]九州大農，[2]香川大農，[3]香川大総合生命，[4]摂南大理工）

4G01-10　オリーブアナアキゾウムシの誘引物質の探索
○髙野 奈海，岸本 憲人 （小豆島ヘルシーランド株式会社）

4G01-11　Effect of Temperature and Salt Conditions on Biological Activities and Phytochemicals of Brown Rice at Germination Stage
○Hasan Mehedi，Xuan Tran Dang （Hiroshima University）

4G01-12　超軽量・柔軟な導電性ナノシートを用いた植物葉の生体電位測定
○谷口 広晃[1]，秋山 和広[2]，藤枝 俊宣[3,4]（[1]早大先進，[2]早大学院，[3]東工大生命，[4]早大ナノ・ライフ創研機構）

4G01-13　*Taq* DNA polymerase による新規タイプの CIS 反応
○川原 昌太郎，永田 裕二，大坪 嘉之 （東北大学院生命）

4G01-14　Discrimination of plasmid-harboring and -free strains using single-cell Raman Spectroscopy
○Zhang Huiting[1], Suzuki-Minakuchi Chiho[1,2], Matsui Motomu[3], Yamaguchi Masataka[4], Kawato Misak[4], Kanno Nanako[4], Okada Kazunori[1], Iwasaki Wataru[3], Shigeto Shinsuke[4], Nojiri Hideaki[1,2]（[1]BRC, UTokyo, [2]CRIIM, UTokyo, [3]Graduate School of Science, UTokyo, [4]Kwansei Gakuin Univ）

ミーティングルームG 質疑応答コアタイム 10:00～10:30

酵素―糖質代謝関連酵素 / その他―

4G03-01　*Flavobacterium johnsoniae* 由来α-1,2- グルコシダーゼの立体構造解析
○中村 駿太郎[1]，中井 博之[2]，朴 龍洙[1,3]，宮崎 剛亜[1,3]（[1]静大院・総合科技・農，[2]新潟大農，[3]静大グリーン科技研）

4G03-02　カイコ由来 GH32 β- フルクトフラノシダーゼ Bm-SUC1 の立体構造解析
○宮崎 剛亜[1,2]，大場 望美[2]，朴 龍洙[1,2]（[1]静大グリーン科技研，[2]静大農）

4G03-03　老化関連β- ガラクトシダーゼおよびその前駆体の構造と機能に関する研究
○清水 まるみ[1]，長谷川 果南[2]，平野 貴子[1,2]，西尾 俊幸[1,2]，袴田 航[1,2]（[1]日大院生資科，[2]日大生資科）

4G03-04　*Aspergillus fumigatus* における真菌型ガラクトマンナンのコアマンナン鎖生合成の構造基盤
○平 大輔，岡 拓二（崇城大生物生命）

4G03-05　シマグワ茶およびその成分イミノ糖によるα- グルコシダーゼ阻害効果の速度論的解析
○喬 穎[1]，中山 珠里[1]，池内 健晃[1]，伊東 昌章[2]，木村 俊之[3]，兒島 憲二[1]，滝田 禎亮[1]，保川 清[1]（[1]京大院・農，[2]沖縄高専・生物資源，[3]農研機構・食品研究部門）

4G03-06　Isomaltose glucohydrolase に特徴的な Phe290 の機能解析
○田上 貴祥，古永 雄太，奥山 正幸，木村 淳夫（北大院農）

4G03-07　セサミノール配糖体加水分解酵素に対するチオグルコシド系界面活性剤の阻害効果と共結晶化の試み
○矢内 太朗[1]，勝村 恵理[1]，本江 俊太郎[2]，和氣 駿之[2]，片岡 邦重[1]，高橋 征司[2]，山下 哲[1]，中山 享[2]（[1]金沢大理工・物質化学，[2]東北大院・工）

4G03-08　GH30 β-1,6- グルコシダーゼのグライコシンターゼ化
○安田 愛梨，三宅 英雄，勝崎 裕隆，梅川 碧里，磯野 直人（三重大院生物資源）

4G03-09　マルトオリゴ糖 4(6)グルコシルトランスフェラーゼのサブサイト変異に伴う 1-4/1-6 転移反応の変化
○尾下 晴紀，澤田 桃，佐分利 亘，森 春英（北大院農）

4G03-10　スクロースシンターゼへのリン酸結合部位導入によるスクロースリン酸シンターゼ活性の付与
○川村 大棋，佐分利 亘，森 春英（北大院農）

4G03-11　バクテロイデス由来α- ガラクトシルセラミド合成酵素の同定と解析
○沖野 望，曲 清俊，石橋 洋平，伊東 信（九州大農）

4G03-12　*Paenibacillus borealis* 由来 3-*O*-β-D- グルコシル-D-グルクロン酸ホスホリラーゼ
○磯野 直人[1]，水谷 映美[2]，林田 春香[2]，勝崎 裕隆[1]（[1]三重大院生物資源，[2]三重大生物資源）

4G03-13　機能改変β-1,6- グルカナーゼを用いたβ-1,6- グルカンの簡易迅速定量法の開発
○山中 大輔[1]，中島 大智[1]，木村 将大[1,2,3]，小山 文隆[2]，大野 尚仁[1]，安達 禎之[1]（[1]東京薬科大薬，[2]工学院大先進工・生命化学科，[3]日本学術振興会特別研究員(PD)）

4G03-14　植物細胞質ペプチド：N- グリカナーゼ(cPNGase)の in vitro での活性測定系の構築
○白井 佐保子[1]，上村 亮太[1]，秋山 剛[1]，前田 恵[1]，梶浦 裕之[2]，三崎 亮[2]，藤山 和仁[2]，木村 吉伸[1]（[1]岡山大院・環境生命，[2]大阪大・生物工学国際交流センター）

4G03-15　ヒトとマウスキトトリオシダーゼのアミノ酸 218 位の置換による活性の評価
○木村 将大[1,2,3]，渡邊 尭[1]，関根 一孝[1]，石塚 ひとみ[1]，池尻 碧[1]，坂口 政吉[1]，山中 大輔[3]，小山 文隆[1]（[1]工学院大先進工，[2]日本学術振興会特別研究員(PD)，[3]東京薬科大薬）

4G03-16　CRISPR/Cas9 システムによる ENGase 欠損トマトの構築
○前田 恵[1]，山本 千晴[1]，篠崎 良仁[2,3]，杉本 貢一[2]，江面 浩[2]，木村 吉伸[1]（[1]岡山大院・環境生命，[2]筑波大・つくば機能植物イノベーション研究センター，[3]東京農工大・グローバルイノベーション研究院）

4G03-17　サツマイモ由来粗酵素による効率的なテアフラビン合成
○廣實 咲紀，智田 遼，松田 寛子，奈良井 朝子（日獣医大応生科）

ミーティングルームH 質疑応答コアタイム 9:30～10:00

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

4H02-01　加硫ゴムから炭酸カルシウムを除去するキノコの作用
○佐藤 伸，稲森 渉，ホアンキム ティエン（公立鳥取環境大学）

4H02-02　炭酸ガス発生量と強熱減量による好気性高温堆肥を用いたポリ乳酸分解率の解析
○添田 紗也加，吉井 貴宏，森屋 利幸，大島 泰郎（共和化工・環境微生物研）

4H02-03　固体腐植物質による生物学的二酸化炭素資源化反応の促進
○笠井 拓哉，ラスカー マハシュウェタ，片山 新太（名大未来研）

4H02-04　L- アミノ酸オキシダーゼ細胞表層提示酵母による食品加工廃棄物からの高効率なアンモニア生産
○渡邉 幸夫[1]，青木 航[1,2]，植田 充美[1,2]（[1]京大院農，[2]JST-CREST）

4H02-05　アセトニトリルおよび塩化ナトリウムを用いた三成分系における 5-hydroxymethylfurfural の生成反応とその速度解析
○古城 侑也，尾西 佑一朗，谷 史人，小林 敬（京都大院農）

4H02-06　マイクロ波を用いる木質バイオマスの精密酸化分解と有用芳香族化合物の合成
○山本 敦士[2,3]，磯部 海志[4]，小坂 優太[4]，樫村 京一郎[5]，藤井 隆司[5]，間瀬 暢之[4]，高谷 光[1,2,3]（[1]分子科学研究所特別研究部門/光科学第三，[2]京都大学大学院工学研究科物質エネルギー化学専攻，[3]京都大学化学研究所，[4]静岡大学工学部化学バイオ工学科，[5]中部大学工学部共通教育科）

4H02-07　実験進化系で得られた人工殺虫剤分解に関与する進化型ハロアルカンデハロゲナーゼ
陳 楠楠，大坪 嘉行，○永田 裕二（東北大生命科）

4H02-08　Characterization of novel 1,4-dioxane-degrading bacteria isolated from a stable 1,4-dioxane-degrading microbial consortium
○Tusher Tanmoy Roy, Shimizu Takuya, Chien Mei-Fang, Inoue Chihiro（Graduate School of Environmental Studies, Tohoku University）

4H02-09　Isolation and characterization of 3-chlorobenzoate degrading bacteria from soils in Shizuoka
○IFAT ARA, Ogawa Naoto, Kimbara Kazuhide, Shintani Masaki（Shizuoka University）

4H02-10　遺伝子組換え生物を特異的に除去する方法の開発
○加藤 祐輔（農研機構・生物研）

4H02-11　微生物を用いた新規雨水浄化処理装置の開発
○戸倉 隆人，荒木 希和子，久保 幹　（立命館大生命）

4H02-12　セルラーゼ生産におけるセルラーゼ誘導物質の探索
○加川 雄介，齋藤 悠香，西山 竜士，野口 拓也，平松 紳吾，山田 勝成　（東レ株式会社）

4H02-13　ベタイン型添加剤によるセルラーゼの活性化　～単離酵素と混合した複数の酵素に与える活性化効果～
○三宅 子龍，甲元 一也　（甲南大　FIRST）

4H02-14　酵母 *Saccharomyces cerevisiae* へのセルラーゼ生産能の付与
○松崎 浩明，渡邉 翔介，志波 勇介，今久保 友則，藤田 雄大，秦野 琢之　（福山大生命工）

4H02-15　遺伝子組換え大腸菌によるフェニル乳酸発酵をモデルとする発酵阻害メカニズムの解明
○川口 秀夫[1]，蓮沼 誠久[1]，佐塚 隆志[2]，高谷 直樹[3]，近藤 昭彦[1]
([1]神戸大学，[2]名古屋大学，[3]筑波大学)

4H02-16　糸状菌 *Trichoderma reesei* を用いた転写因子制御による誘導物質フリーの糖化酵素生産システム
○新井 俊陽，一瀬 桜子，柴田 望，掛下 大視，児玉 裕司，小山 伸吾，五十嵐 一暁，瀧村 靖　（花王・生科研）

4H02-17　木材腐朽菌を用いた，竹，ダンチクからのエタノール生産
○島崎 幹生，山中 優花，堀沢 栄　（高知工科大学）

ミーティングルームH 質疑応答コアタイム 10:30～11:00

English Session―微生物 / 植物 / 動物 / 生物科学―

4H04-01　THE EVALUATION OF SECONDARY INJURY IN HEATED *ESCHERICHIA COLI* CELLS BY DIFFERENT ENUMERATION METHODS
○Vo Khanh[1]，Asada Ryoko[1,2]，Sakamoto Jin[2]，Tsuchido Tetsuaki[2]，Furuta Masakazu[1,2]　([1]Dept. Quantum and Radiation, Grad. School of Engineering, Osaka Prefecture Univ.，[2]Research Center of Microorganism Control, Organization of Research Promotion, Osaka Prefecture Univ.)

4H04-02　Promotion of nitrogen-fixation activity of diverse heterotrophic diazotrophs by supplying extracellular electrons from humin, a solid-phase humic substance.
○DEY SUJAN[1]，KASAI TAKUYA[1,2]，KATAYAMA ARATA[1,2]　([1]Nagoya University, Department of Civil and Environmental Engineering.，[2]Nagoya University, Institute of Materials and Systems for Sustainability, Nagoya University (IMaSS).)

4H04-03　Improvement of Kluyeromyces marxianus DMKU3-1042 by repetitive long-term cultivation at high temperature
○PATTANAKITTIVORAKUL Sornsiri[1]，TSUZUNO Tatsuya[1]，KOSAKA Tomoyuki[1,2]，YAMADA Mamoru[1,2]　([1]Grad. Sch. of Sci. and Tech. for Inno.，Yamaguchi Univ.，[2]Res. Cen. For TMR, Yamaguchi Univ.)

4H04-04　Adaptive improvement of a thermotolerant xylose-fermenting yeast isolated from Laos
○PHOMMACHAN Koudkeo[1]，Keo-oudone Chansome[2]，Nurcholis Mochamad[3]，Bounphanmy Somchanh[2]，Tomoyuki Kosaka[1,4]，Yamada Mamoru[1,4]　([1]Grad. Sch. of Sci. and Tech. for Inno, Yamaguchi Univ.，[2]Fac. of Sci., Nat. Univ. of Laos，[3]Fac. of Agri. Tech., Univ. of Brawijaya，[4]Res. Cen. for TMR, Yamaguchi Univ.)

4H04-05　A new cytokinin-type compound and cytotoxic tryptamine derivatives from *Streptomyces* sp. 80H647
○LOPEZ Julius[1]，NOGAWA Toshihiko[1]，FUTAMURA Yushi[1]，AONO Harumi[1]，YOSHIDA Kazuko[1]，HASHIZUME Daisuke[2]，OSADA Hiroyuki[1]　([1]RIKEN CSRS，[2]RIKEN CEMS)

4H04-06　A new peptaibol from the fungus *Trichoderma* sp. RK10-F026 by culture condition-dependent screening
○AMIR RAWA MIRA SYAHFRIENA[1,2]，Nogawa Toshihiko[1]，Okano Akiko[1]，Futamura Yushi[1]，Nakamura Takemichi[1]，A. Wahab Habibah[2]，Osada Hiroyuki[1]　([1]RIKEN CSRS，[2]Universiti Sains Malaysia)

4H04-10　Two PLAT domain-containing proteins, FcPLAT and EtATS3, increase plants resistance to insects.
○SAVADOGO Hyrmeya Eric[1]，Yui Shiomi[1]，Yasuda Junko[1]，Akino Toshiharu[2]，Yamaguchi Masamitsu[1]，Yoshida Hideki[1]，Umegawachi Takanari[1]，Tanaka Ryo[1]，Suong Anh Ngoc Dang[1]，Miura Kenji[3,4]，Yazaki Kazufumi[5]，Kitajima Sakihito[1,2]　([1]Department of Applied Biology, Kyoto Institute of Technology，[2]The Center for Advanced Insect Research Promotion, Kyoto Institute of Technology，[3]Faculty of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba，[4]Tsukuba-Plant Innovation Research Center, University of Tsukuba，[5]Research Institute for Sustainable Humanosphere, Kyoto University)

4H04-11　P700 oxidation in photosystem I confers stronger chilling tolerance in cucumber
○Che Yufen[1]，Takeuchi Ko[2]，Kumazawa Minoru[1]，Nakano Takeshi[1,2]，Miyake Chikahiro[3]，Ifuku Kentaro[1,2]　([1]Grad. Sch. Biostudies, Kyoto Univ，[2]Fac. Agri., Kyoto Univ，[3]Grad. Sch. Agri., Kobe Univ)

4H04-12　Rice response to UV-irradiation via chemical biosynthesis pathway and relevant gene expression
○LA Hoang Anh[1]，Quan Nguyen Van[1]，Xuan Tran Dang[1]，Lam Vu Quang[2]，Takami Akiyoshi[2]　([1]Hiroshima Univ.，[2]Aichi Medical University School of Medicine)

4H04-13　An Argon Ion-Induced Pale Green Mutant of *Arabidopsis* Exhibiting Epidermis-Specific Albinism and Accelerated Leaf Senescence
○SANJAYA Alvin[1]，MURAMATSU Ryohsuke[1]，SATO Shiho[1]，SUZUKI Mao[1]，ISHIKAWA Hiroki[1]，SASAKI Shun[1]，ISHII Kotaro[2]，OHBU Sumie[2]，ABE Tomoko[2]，KAZAMA Yusuke[2,3]，FUJIWARA Makoto[1,2]　([1]Sophia Univ.，[2]RIKEN Nishina Center，[3]Fukui Prefectural Univ.)

4H04-14　Investigation of biological activities of AC94377 and its derivatives in rice
○wang jianwen[1]，Jiang Kai[2]，Murase Kohji[1]，Ota Tsuyoshi[1]，Takayama Seiji[1]，Tadao Asami[1]　([1]Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo，[2]SUSTech Academy for Advanced and Interdisciplinary Studies, Southern University of Science and Technology (SUSTech))

4H04-15　Identification of effective peptide derived from WSSV-VP15 for protection of *Masupenaeus japonicus* against WSSV
○Boonyakida Jirayu[1]，Xu Jian[2]，Satoh Jun[3]，Nakanishi Takafumi[4]，Mekata Toru[3]，Kato Tatsuya[1,2,4]，Park Enoch Y.[1,2,4]　([1]Department of Bioscience, Graduate School of Science and Technology, Shizuoka University，[2]Research Institute of Green Science and Technology, Shizuoka University，[3]National Research Institute of Aquaculture, Japan Fisheries Research and Education Agency，[4]Department of Applied Biological Chemistry, Graduate School of Integrated Science and Technology, Shizuoka University)

4H04-16　Dual-mode detection of Chikungunya virus protein using fluorophore-embedded and redox probe-encapsulated liposome
○Nasrin Fahmida[1]，Dutta Chowdhury Ankan[1]，Akhilesh Babu Ganganboina[1]，Ojodomo John Achadu[1]，Hossain Farzana[2]，Yamazaki Masahito[2]，Y Park Enoch[1]　([1]Lab of Biotech, Res Inst of Green Sci and Tech, Shizuoka Univ，[2]Integ Biosci Sec, Res Inst of Elec, Shizuoka Univ)

4H04-17　The nature of δ opioid receptor as an immunomodulator in the colitis
○NAGATA Kazuki[1], NAGASE Hiroshi[2], YASHIRO Takuya[1], NISHIYAMA Chiharu[1]（[1]Tokyo Univ of Sci., [2]IIIS）

ミーティングルームⅠ　質疑応答コアタイム 9:00～9:30

植物―生物間相互作用 / タンパク質，酵素 - 機能，調節 / 植物工学 - 育種，物質生産，形質転換―

4I01-01　イネ受容体型キナーゼ ERC1 による細菌由来 EF-Tu の中央領域 EFa50 の認識
○伊庭 弘貴[1]，古川 岳人[2]，平井 洋行[2]，蔡 晃植[1,2,3]（[1]長浜バイオ大院・バイオ，[2]長浜バイオ大・バイオ，[3]長浜バイオ大・ゲノム編集研究所）

4I01-02　Identification of novel effector protein AKSF1 that suppresses rice immune response
○大森 ほのか[1]，川口 雄正[1]，中村 みなみ[2]，平井 洋行[1]，近藤 真千子[1]，蔡 晃植[1,2,3]（[1]長浜バイオ大・バイオ，[2]長浜バイオ大院・バイオ，[3]長浜バイオ大・ゲノム編集研究所）

4I01-03　植物病原細菌 *Acidovorax avene* のイネ病原性 K1 菌株と非病原性 N1141 菌株が持つ RHIF エフェクターの異なる機能
○中村 みなみ[1]，近藤 真千子[2]，川口 雄正[2]，上田 陽莉[2]，大森 ほのか[2]，蔡 晃植[1,2,3]（[1]長浜バイオ大院・バイオ，[2]長浜バイオ大・バイオ，[3]長浜バイオ大・ゲノム編集研究所）

4I01-04　コマツナ内生菌 *Arthrobacter* sp. BR2S-6 株の植物免疫を活性化する成分の解析
○島脇 遼，黒川 摩利，中野 正貴，中島 将博，朽津 和幸，古屋 俊樹（東京理科大院理工）

4I01-05　*BSR1* 高発現により生じる病害抵抗性の増強に Os-CERK1 が必要である
神田 恭和[1,2]，西澤 洋子[1]，鎌倉 高志[2]，○森 昌樹[1,2]（[1]農研機構生物研，[2]東理大院理工）

4I01-06　植物は毒針（針効果）で昆虫を撃退する？－シュウ酸カルシウム針状結晶が植物防御タンパク質・物質の働きを劇的に増強する相乗効果
○今野 浩太郎，松本 信弘，行弘 文子（農研機構　生物機能利用研究部門）

4I01-07　比較機能解析によるモノテルペン合成酵素の反応制御機構の解明
○栗栖 尚嗣，角掛 陽，茂木 大介，菊池 洋平，廣森 美樹，和氣 駿之，中山 亨，高橋 征司（東北大工）

4I01-08　サポジラ（*Manilkara zapota*）由来 *trans* 型プレニルトランスフェラーゼ によるイソプレノイドポリマーの *in vitro* 合成
○三輪 幸祐[1]，廣森 美樹[1]，青木 裕一[2]，和氣 駿之[1]，小島 幸治[1]，山下 哲[3]，山口 晴彦[4]，宮城 ゆき乃[4]，戸澤 譲[5]，中山 亨[1]，高橋 征司[1]（[1]東北大・院・工，[2]東北大・東北メディカルバンク，[3]金沢大・院・自然科学，[4]住友ゴム工業(株)，[5]埼玉大・院・理工）

4I01-09　ダイズのイソフラボングルコシルトランスフェラーゼの触媒重要残基の検索
○中山 亨[1]，佐藤 誠哉[1]，伊藤 圭介[1]，高橋 征司[1]，和氣 駿之[1]，高橋 厚人[2]，大山 拓次[2]，楠木 正巳[2]，今泉 璃城[3]，山下 哲[3]（[1]東北大院工，[2]山梨大院・生命環境，[3]金沢大院・理工）

4I01-10　イネ科植物における HCAA 生合成酵素 ACT の解析
○山根 美代[1]，竹野谷 美穂子[2]，矢嶋 俊介[2]，松島 芳隆[1]，須恵 雅之[1]（[1]東京農大・農化，[2]東京農大・バイオ）

4I01-11　Se 存在下での GAPC 活性強化は GSH を介した翻訳後修飾による Se 結合に起因する
○高貝 俊生[1]，小嵜 光夏[2]，武田 徹[1,2]（[1]近畿大院農，[2]近畿大農）

4I01-12　多剤不活性化酵素 HIS1 およびそのホモログの新たな代謝基質の発見とその解析
○親松 紗璃依[1]，山崎 明彦[2]，酒井 基成[2]，廣瀬 咲子[3]，大島 正弘[3]，黒木 慎[3]，戸澤 譲[1]（[1]埼玉大院理工，[2](株)エス・ディー・エス バイオテック，[3]農研機構）

4I01-13　植物葉における KODA 生産のための技術基盤の構築
○若松 孝幸[1]，井原 雄太[1,2]，横山 峰幸[3]，前澤 大介[2,4]，太田 啓之[1,2]，下嶋 美恵[1,2]（[1]東京工業大学, 生命理工学院，[2]OPERA, JST，[3]東京農工大学大学院, 農学研究院，[4]癸巳化成株式会社）

4I01-14　*esp2* 突然変異を導入した水稲系統における米粉特性と種子貯蔵成分と遺伝子発現の変化
○堀 清純[1]，飯島 健[1]，朱 紅加[1]，小山 翔大[2]，小澤 佳祐[2]，辻井 良政[2]，山本 敏央[1,3]，熊丸 敏博[4]，奥西 智哉[5]（[1]農研機構・作物開発セ，[2]東京農大応生・農化，[3]岡山大・植物，[4]九州大・院農，[5]農研機構・食品研）

4I01-15　枝作り酵素（BE）IIb 変異体にインディカ米由来の遺伝子を導入した #1203 系統の戻し交配による農業形質の向上と胚乳澱粉の特性解析
○三浦 聡子，成田 真衣子，伊藤 優季，クロフツ 尚子，保坂 優子，追留 那緒子，阿部 美里，藤田 直子（秋田県大　生物資源）

4I01-16　植物における一体型ベクターを利用した CRISPR/Cas9 による標的切断誘導的なジーンターゲッティング系の確立
○横井 彩子[1,2]，三上 雅史[1]，土岐 精一[1,3]（[1]農研機構・生物研，[2]JST・さきがけ，[3]横浜市大・木原生研）

ミーティングルームⅠ　質疑応答コアタイム 10:00～10:30

植物―生物間相互作用 / タンパク質，酵素 - 機能，調節 / 植物工学 - 育種，物質生産，形質転換―

4I03-01　トマト根が分泌するトマチンによる根圏細菌叢の制御
○中安 大[1]，大野 滉平[1]，高松 恭子[1]，青木 裕一[2]，山崎 真一[2]，髙瀬 尚文[3]，庄司 翼[4,5]，矢崎 一史[1]，杉山 暁史[1]（[1]京都大・生存研，[2]東北大・ToMMo，[3]京都先端大・バイオ環境，[4]奈良先端大・バイオサイエンス，[5]理研・CSRS）

4I03-02　水耕栽培と圃場栽培トマトの比較によるトマチン生合成及び分泌の解析
○高松 恭子[1]，中安 大[1]，山崎 真一[2]，青木 裕一[2]，永野 惇[3]，髙瀬 尚文[4]，庄司 翼[5,6]，矢崎 一史[1]，杉山 暁史[1]（[1]京都大・生存研，[2]東北大・ToMMo，[3]龍谷大農，[4]京都先端大・バイオ環境，[5]奈良先端大・バイオサイエンス，[6]理研・CSRS）

4I03-03　土壌環境の違いが非根圏，根圏，および根内における細菌に及ぼす影響の解析
○坪倉 美紗，荒木 希和子，久保 幹（立命館大生命）

4I03-04　有機資材がネコブ病発症に与える抑制効果の解析
○雲川 雄悟，荒木 希和子，久保 幹（立命館大生命）

4I03-05　大豆発芽時の植物－微生物間生存競争における種子からの抗菌性酢酸の生成
○長瀬 鮎美，杉浦 春香，渡辺 大輔，橋本 渉（京大院農）

4I03-06　栄養塩と生活史がオゴノリ科海藻の赤血球凝集活性に及ぼす影響
○垣田 浩孝[1]，小比賀 秀樹[2]（[1]日大院総合基，[2]産総研健康工学）

4I03-07　トマト栽培品種と野生品種におけるレクチン分子種の分布と活性の比較
○小栗 秀，絵面 香央梨，岡本 三奈，佐藤 里杏人，長澤 将太，坂本 光（東農大生物産業）

4I03-08　イネのプラントオパールに含まれる有機基質と防御タンパク質
○尾崎 紀昭[1]，鈴木 道生[2]，Nudelman Fabio[3]（[1]秋田県大生資科，[2]東大農，[3]エジンバラ大理工）

4I03-09　ヤセウツボ種子内においてプランテオースを加水分解するα - ガラクトシダーゼの局在の解明
○岡野 ひかる[1]，小川 拓水[1]，杉本 幸裕[2,3]，太田 大策[1]，岡澤 敦司[1,3]（[1]阪府大生命環境，[2]神戸大農，[3]JST/JICA SATREPS）

4I03-10　β - コングリシニンとグリシニンの超複合体形成メカニズムの解析
○奥田 綾[1]，栗栖 文彦[2]，東野 ゆうき[2]，増田 太郎[2]，清水 将裕[1]，守島 健[1]，佐藤 信浩[1]，井上 倫太郎[1]，杉山 正明[1]，裏出 令子[1]（[1]京大複合研，[2]京大院農）

4I03-11　ナノディスク上に再構成した天然ゴム生合成酵素の活性解析
○黒岩 風[1]，西野 輝[1]，廣森 美樹[2]，モンドル 慶子[1]，山口 晴彦[3]，宮城 ゆき乃[3]，山下 哲[4]，高橋 征司[2]，戸澤 譲[1]（[1]埼玉大院理工，[2]東北大院工，[3]住友ゴム工業(株)，[4]金沢大理工）

4I03-12　接合伝達を利用した単細胞真核紅藻 *G. sulphuraria* への外来遺伝子導入系の確立
○中村 裕太[1]，板谷 光泰[2]，渡辺 智[1]（[1]東農大農，[2]信州大工）

4I03-13　無細胞翻訳系を用いた *Chlamydomonas reinhardtii* 由来脂肪滴へのタンパク質導入系の確立とそれを用いた脂肪滴移行配列の探索
○開 琢海[1]，廣森 美樹[1]，和氣 駿之[1]，山下 哲[2]，戸澤 譲[3]，山口 晴彦[4]，宮城 ゆき乃[4]，岩井 雅子[5]，太田 啓之[5]，中山 亨[1]，高橋 征司[1]（[1]東北大・院・工，[2]金沢大・院・自然科学，[3]埼玉大・院・理工，[4]住友ゴム工業(株)，[5]東工大・生命理工院）

4I03-14　NBRP トマト変異体コレクションの代謝物データとその利用
○杉本 貢一[1]，星川 健[1,2]，篠崎 良仁[1,3]，伊藤 直子[1]，藤森 陽子[1]，江面 浩[1]（[1]筑波大 T-PIRC，[2]国際農研 生物資源・利用，[3]東京農工大 グローバルイノベーション研究院）

4I03-15　アブシジン酸存在下で増殖と細胞死を共に抑制したタバコ BY-2 細胞からのタンパク質の分泌
○井上 智晴[1]，小田 大和人[1]，丸山 明子[1,2]，松岡 健[1,2]（[1]九大・院生資環，[2]九大・院農）

ミーティングルーム J　質疑応答コアタイム 9:30～10:00

動物―細胞 - 細胞機能，細胞骨格，オルガネラ，輸送体，細胞接着，細胞内輸送 / 個体 - 生理・栄養・代謝，生体機能，生体制御，メタボローム / 遺伝子 - 構造，発現制御，機能，修飾，トランスクリプトーム，エピジェネティクス , ゲノミクス，ゲノム編集―

4J02-01　高グルコースが細胞の機能に与える影響
○萩原 真[1]，松下 健二[2]（[1]新潟県大健康栄養，[2]国立長寿口腔疾患）

4J02-02　サル膵管オルガノイド作製と Tuft 細胞への分化誘導系の確立
○坂口 恒介[1]，中嶋 ちえみ[2]，稲葉 明彦[3]，石井 栞[1]，熊谷 孝太郎[1]，佐藤 晃司[1]，今井 啓雄[3]，山根 拓実[1]，大石 祐一[1]，岩槻 健[1]（[1]東京農大応用，[2]遺伝研神経，[3]京大ゲノム）

4J02-03　Afamin-Wnt3a CM は霊長類消化管オルガノイドの細胞分化をサポートする
○有永 理峰[1]，岡村 真子[1]，山本 咲也香[1]，トゥープティアンラット ナパッソーン[1]，稲葉 明彦[2]，今井 啓雄[2]，山根 拓実[1]，大石 祐一[1]，岩槻 健[1]（[1]東京農大　応用，[2]京大）

4J02-04　コラーゲン架橋分子ピリジノリンは破骨細胞分化を抑制する
○岡田 楓夏，三宅 春奈，関口 陽香，村上 庸人，早瀬 文孝，渡辺 寛人（明治大農）

4J02-05　がん細胞の増殖と遊走に対するコラーゲンペプチドの効果
○倉田 淳代[1]，木村 泰久[1]，松尾 道憲[2]，木岡 紀幸[1]（[1]京都大農，[2]京都女子大家政）

4J02-06　メチオニンは TSC2 メチル化を介して mTORC1 活性を制御する
○玄 成秀，松本 雄宇，鈴木 司，井上 順，山本 祐司（東京農業大学）

4J02-07　CNBP による mTORC1 活性化機構の解析
○中川 晃貴[1]，島村 勝太[2]，松本 雄宇[1,2]，鈴木 司[1,2]，井上 順[1,2]，山本 祐司[1,2]（[1]東農大院・農・農化，[2]東農大・応生・農化）

4J02-08　AMPK は SRSF9 をリン酸化することでβ -catenin のタンパク質合成を制御する
○松本 英里[1]，松本 雄宇[1,2]，鈴木 司[1,2]，井上 順[1,2]，山本 祐司[1,2]（[1]東農大院・農・農化，[2]東農大・応生・農化）

4J02-09　腸内細菌叢を介したアンドロゲンのエネルギー代謝調節
○原田 直樹[1]，花田 一貴[1]，南 友香梨[1]，乾 博[2]，山地 亮一[1]（[1]大阪府大・生命環境，[2]大阪府大・栄養）

4J02-10　唾液ムチン 10 の糖鎖修飾と糖転移酵素発現に及ぼすアンドロゲンの作用
○出南 真奈[1]，原田 直樹[1]，乾 博[2]，山地 亮一[1]（[1]大阪府大生命環境，[2]大阪府大栄養）

4J02-11　細胞分裂過程における HP1 αクロモドメインとヒストン H3 の結合状態の経時観察
○佐々木 和樹[1]，鈴木 律裕[2]，中尾 洋一[2]，吉田 稔[1,3,4]（[1]理研 CSRS・ケミカルゲノミクス，[2]早大先進理工化学・生命科学，[3]東大院農　応生工，[4]東大　微生物連携機構）

4J02-12　「ソルビン酸由来リジン修飾による遺伝子発現制御機構の解明」
○清水 勇希[1]，則次 恒太[1]，鈴木 健裕[2]，小池 晃太[3]，どど 孝介[3,4]，袖岡 幹子[3,4]，堂前 直[2]，伊藤 昭博[1]（[1]東薬大　生命科学，[2]理研CSRS　生命分子解析，[3]理研CPR　袖岡有機合成化学，[4]理研CSRS　触媒・融合研究）

4J02-13　核内アクチン繊維形成とゲノム機能制御におけるアクチンファミリー Arp4 の役割
○上野 佑也[1]，山崎 祥他[2]，GERHOLD Christian[3]，山本 浩志[1]，宮本 圭[4]，原田 昌彦[1]（[1]東北大・院農，[2]理研，[3]FMI，[4]近大・院生物理工）

4J02-14　INK4 遺伝子座から転写される 2 つの長鎖ノンコーディング RNA の機能解析
○神武 洋二郎，松永 夏実，岡田 凌太朗（近大院産理工）

4J02-15　mRNA 核外輸送因子 UAP56 と URH49 による mRNA スプライシング制御機構の解明
○池田 宥哉[1]，藤田 賢一[2]，吉岡 英恵[1]，増田 誠司[1]（[1]京都大学，[2]藤田医大）

ミーティングルーム J　質疑応答コアタイム 10:30～11:00

動物―細胞 - 情報伝達，細胞応答，分化制御 / 個体 - 生理・栄養・代謝，生体機能，生体制御，メタボローム / 遺伝子 - 構造，発現制御，機能，修飾，トランスクリプトーム，エピジェネティクス , ゲノミクス，ゲノム編集―

4J04-01　メバロン酸経路はヒト iPS 細胞由来骨格筋細胞においてタンパク質恒常性を制御する
○ZHAO XIAOLIN[1]，久保 美遥[1]，櫻井 英俊[2]，佐藤 隆一郎[1]，山内 祥生[1]（[1]東大院・農生科・応生化，[2]京大・CiRA）

4J04-02　ヒト iPS 細胞由来骨格筋細胞を利用した Myostatin と GDF11 の活性評価
○本多 美香子[1]，櫻井 英俊[2]，佐藤 隆一郎[1]，山内 祥生[1]（[1]東大院・農生科・応生化，[2]京大・CiRA）

4J04-03　筋サテライト細胞が速筋線維に分化するのに必要な転写因子群の同定
○大平 悠人[1]，藤田 真理子[1]，瀧川 花穂[1]，吉岡 潔志[2]，小野 悠介[2]，亀井 康富[1]（[1]京都府大・生命環境，[2]熊本大・発生医学研究所）

4J04-04　老化筋芽細胞の分化不全・筋萎縮形質は，細胞外小胞を介して周辺細胞に伝播する
杉村 友梨，服部 秀美，○江藤 望（宮崎大農）

4J04-05　培養細胞を用いたたばこ製品の酸化ストレス・炎症応答評価手法の構築
○石川 晋吉，倉知 孟史，森 さくら，田邉 郁也，石森 かな江（日本たばこ産業株式会社）

4J04-06　アオコ由来毒素ミクロシスチン -LR の慢性的な低濃度曝露は大腸において JNK の活性化を介して MCP-1 の発現増加を導く

○古東 義仁[1]，河原 秀明[2]，蔵田 航一[2]，吉清 恵介[3]，杉浦 則夫[4]，清水 和哉[4]，清水 英寿[3]　([1]島大院・自然，[2]島大院・生資，[3]島大・学術，[4]筑波大・生環系)

4J04-07　骨格筋特異的な胆汁酸受容体 TGR5 の過剰発現はグルコースクリアランスを改善する

○佐々木 崇[1]，渡邉 雄一[1]，久保山 文音[1]，及川 彰[2]，清水 誠[1]，山内 祥生[1]，佐藤 隆一郎[1]　([1]東大院農生科・応生化，[2]山形大農)

4J04-08　E3 ユビキチンリガーゼ RNF122 の骨格筋における発現制御機構及び機能解析

○栄田 陸人[1]，桑田 啓子[2]，柴田 貴広[3]，佐々木 崇[1]，高橋 裕[1]，山内 祥生[1]，佐藤 隆一郎[1]　([1]東大院・農生科・応生化，[2]名大・ITbM，[3]名大院生命農)

4J04-09　C3H マウスにおける脂質異常症の原因遺伝子の同定

○小林 美里[1]，石井 玲佳[1]，神戸 芙美[1]，加藤 大和[1]，一柳 健司[1]，大野 民生[2]，宮坂 勇輝[2]，村井 篤嗣[1]，堀尾 文彦[1]　([1]名古屋大院生命農，[2]名古屋大院医学系)

4J04-10　コリン欠乏メチオニン減量高脂肪食誘導 NASH モデルマウスにおいて炭水化物代謝およびメチオニン代謝は肝線維化に関連する

○三浦 徳[1]，川手 啓吾[3]，増澤(尾崎) 依[2]，細野 崇[2,3]，関 泰一郎[1,2,3]　([1]日大・生資科・総合研究所rch Institute，[2]日大・生資科・生命化，[3]日大院・生資科・応生科)

4J04-11　コレステロール生合成を抑制する Felinine 経路の機能解析

○土井 侃昂，三浦 舞音，上野山 怜子，宮崎 珠子，宮崎 雅雄　(岩手大学農)

4J04-12　コレステロール輸送体 ABCA1 が担う新規生理的役割をメダカを用いて探索する

○二股 良太[1]，木下 政人[2]，木岡 紀幸[1,3]，植田 和光[3]　([1]京大院農・応用生命，[2]京大院農・応用生物，[3]京大・iCeMS)

4J04-13　筋萎縮応答性線維芽細胞増殖因子 FGF13 の骨格筋細胞における機能解析

○野口 惇，清水 誠，山内 祥生，佐藤 隆一郎　(東大院・農生科・応生化)

4J04-14　骨格筋萎縮における抗肥満ホルモン FGF21 の発現制御機構および機能解析

○川邊 充希，清水 誠，三浦 雄也，橋詰 力，山内 祥生，佐藤 隆一郎　(東大院・農生科・応生化)

4J04-15　骨格筋損傷における核内受容体 LXR の機能解析

○高瀬 飛天[1]，清水 誠[1]，小野 敦子[1]，近澤 未歩[1,2]，山内 祥生[1]，佐藤 隆一郎[1]　([1]東大院・農生科・応生化，[2]名城大学・農学部・応用生物化学科・栄養・食品学研究室)

4J04-16　伸張性収縮を模倣した骨格筋細胞の新たな運動モデルの構築

○清水 誠，髙瀬 飛天，佐藤 弘樹，山内 祥生，佐藤 隆一郎　(東大農)

講演番号：2A01-01
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 09:00～ ミーティングルーム A

III 型 PKS を利用した methylmalonyl-CoA からの新規多置換芳香族化合物の合成

Synthesis of novel polysubstituted aromatic compounds from methylmalonyl-CoA by a type III polyketide synthase.

○飯塚 恭平[1]、石井 義孝[2]、桐村 光太郎[1] ([1]早大院先進理工、[2]早大理工総研)
○Kyohei IIDUKA[1], Yoshitaka ISHII[2], Kohtaro KIRIMURA[1] ([1]Graduate school of Advance Science and Engineering, Waseda Univ., [2]Waseda Research Institute for Science and Engineering, Waseda Univ.)

【目的】

III 型ポリケチド合成酵素 (PKS, EC 2.3.1.X) は、脂肪酸 acyl-CoA と malonyl-CoA の縮合および環化反応により生理活性物質であるポリケチドを合成する酵素である。演者らは、クロコウジカビ *Aspergillus niger* NRRL328 由来 III 型 PKS をコードする遺伝子 (*An-csyA*) の同定と異種発現に成功している[1]。組換え An-CsyA は広範な基質特異性を有しており、malonyl-CoA を伸長基質のみならず開始基質にも利用可能である。本研究では、An-CsyA を用いた抗生物質や免疫抑制剤などの前駆体としての利用可能性がある多置換芳香族化合物の合成を目的とした。

【方法および結果】

演者らは、An-CsyA が malonyl-CoA 誘導体である methylmalonyl-CoA を利用可能なことに着目した。とくに、methylmalonyl-CoA を唯一の基質とした酵素反応において、2 種類の化合物の合成が確認された。LC-Q-TOFMS や HR-MS、^{1}H-, ^{13}C- NMR 分析により、6-ethyl-4-hydroxy-3,5-dimethylpyran-2-one ($C_9H_{12}O_3$) および 6-(1-methyl-2-oxobutyl)-4-hydroxyl-3,5-dimethylpyran-2-one ($C_{12}H_{16}O_4$) と構造を決定した。とくに、 $C_{12}H_{16}O_4$ の化合物は報告例のない新規な 2-pyrone である。また、酵素反応系に malonyl-CoA と methylmalonyl-CoA が基質として存在するとき、3,5-dimethylorselinic acid が検出された。この化合物は糸状菌が産生するメロテルペノイドの基幹物質であり、I 型 PKS による合成が報告されているが[2]、III 型 PKS による合成は報告例がない。以上より、An-CsyA による多置換芳香族化合物を含む新規化合物の合成を達成した。

The objective of this study is to synthesize novel polyketides containing polysubstituted aromatic compounds by type III PKS. We confirmed that An-CsyA, a fungal type III PKS, utilized methylmalonyl-CoA as the sole substrate to produce two novel compounds. These compounds were identified as 6-ethyl-4-hydroxy-3,5-dimethylpyran-2-one ($C_9H_{12}O_3$) and 6-(1-methyl-2-oxobutyl)-4-hydroxyl-3,5-dimethylpyran-2-one ($C_{12}H_{16}O_4$) by LC-MS and NMR analysis. When malonyl-CoA and methylmalonyl-CoA were used as substrates, the synthesis of 3,5-dimethylorselinic acid by An-CsyA was detected. Thus, the synthesis of novel polyketides containing polysubstituted aromatic compounds by An-CsyA was achieved.

[1] K. Kirimura, *et. al., Biophys. Biochem. Res. Commun.*, **2016**, *437*, 1106-1010.
[2] H.-C. Lo, *et al., J. Am. Chem. Soc*. **2012**, 134, 4709−4720.

methylmalonyl-CoA, polysubstituted aromatic compounds, type III polyketide synthase

講演番号：2A01-02
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 09:00～ ミーティングルーム A

麹床を用いた高麗人参含有メジャージンセノサイドのマイナージンセノサイドへの変換

Transformation of major ginsenosides into minor ginsenosides in ginseng by pickling in salted rice malt paste

○杉本 学[1]、村上 允唯[2] ([1]岡山大植物研、[2]（株）機能性食品開発研究所)
○Manabu SUGIMOTO[1], Nobutada MURAKAMI[2] ([1]Okayama Univ., [2]Functional Food Creation Res. Inst. Co., Ltd.)

高麗人参の主要な薬用部位は根で有用成分はジンセノサイドである。高麗人参に含まれる主要なメジャージンセノサイドである Rb1, Rd はβ-グルコシダーゼにより Rb1→Rd→F2→CK と代謝される。このうちマイナージンセノサイドである F2 と CK は高麗人参の根にほとんど存在しない希少ジンセノサイドである。本研究では、安価で容易にマイナージンセノサイドを含む多組成ジンセノサイド含有高麗人参の新規調製を目的として、無加工の生の高麗人参を麹床へ漬け込むことによる含有ジンセノサイド組成の変化について検討した。米麹菌(*Aspergillus oryzae*)、醤油麹菌(*A. sojae*)、白麹菌(*A. kawachii*)、黒麹菌(*A. luchuensis*)をグルコース含有液体培地で 26℃16 日間培養した。遠心分離で得た上清（粗酵素液）を Rb１溶液と混合し 37℃で反応したところ、反応４日後に *A. oryzae* 粗酵素液では Rb１は消失し Rd と F2 が、*A. sojae* 粗酵素液では Rd が、*A. kawachii* と *A. luchuensis* 粗酵素液では Rb1 は消失し F2 と CK が出現した。*A. kawachii* を 20%塩化ナトリウム含有炊飯米に植菌し室温暗所で 14 日間静置して調製した麹床に生の高麗人参６年根と１年根を漬け込んだ。漬け込む前の６年根と１年根から抽出したジンセノサイドエキスの組成はそれぞれ Rb1:Rd:F2:CK=72:28:0:0、Rb1:Rd:F2:CK=68:32:0:0 であったが 28 日漬け込んだ後に６年根と１年根から抽出したジンセノサイドエキスの組成はそれぞれ Rb1:Rd:F2:CK=35:45:8:12、Rb1:Rd:F2:CK=40:39:7:14 となった。

Minor ginsenosides F2 and compound K (CK) were produced in ginseng by pickling in a salted rice malt paste fermented using *Aspergillus kawachii*. The *A. kawachii* excluded β-glucosidase in the culture broth with 125 mU/mL after 16 d cultivation, and the culture broth hydrolyzed major ginsenoside Rb1 to generate F2 and CK on the pathway Rb1→Rd→F2→CK. Steamed rice was fermented by *A. kawachii* with 14% NaCl to produce a salted rice malt paste as a pickle bed with 165 mU/mL of β-glucosidase. The extract of 6-year-old and 1-year-old pickled ginseng showed production of F2 and CK, and changed the ratio of Rb1, Rd, F2, and CK.

compound K, ginsenoside, transformation

発表責任者：杉本　学（manabus@okayama-u.ac.jp）

講演番号：2A01-03
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 09:00～ ミーティングルーム A

土壌微生物における *C*-配糖体代謝の初発酵素反応

Metabolism of *C*-glycoside by soil microorganism.

○渡辺 聖実、堀 早苗、寺下 柚子、橋本 義輝、熊野 匠人、小林 達彦（筑波大生命）
○ Satomi WATANABE, Sanae HORI, Yuzu TERASHITA, Yoshiteru HASHIMOTO, Takuto KUMANO, Michihiko KOBAYASHI (Tsukuba Univ.)

C-配糖体はアグリコン（非糖部分）の炭素骨格に糖のアノマー炭素が直接 C-C 結合（以下 *C*-グリコシド結合とする）した配糖体である。葛に含まれるプエラリンや、マンゴーに含まれるマンギフェリン、赤色の食用色素であるカルミン酸など 100 種類以上が植物や昆虫、微生物から単離され知られている。一般的な配糖体である *O*-配糖体の *O*-グリコシド結合と比べて *C*-グリコシド結合は熱や酸に安定で、グリコシダーゼによる酵素的な分解も受けない。そのような性質から、他の配糖体とは異なった代謝経路により分解・代謝されることが予想された。最近、*C*-配糖体を代謝する腸内細菌から *C*-配糖体代謝酵素が報告され、２段階の反応で *C*-グリコシド結合が分解されることが明らかになった。一方、土壌細菌による *C*-配糖体代謝は未解明であったが、我々は赤色色素であるカルミン酸を分解する土壌微生物より、*C*-配糖体代謝の初発酵素を見出した。土壌細菌も腸内細菌同様に *C*-配糖体を代謝するものの、初発酵素は腸内細菌の酵素とは異なることがわかった。本発表では、この新規な C-配糖体代謝酵素について解析した結果について報告する。

C-glycoside is a type of glycoside whose sugar moiety is linked to aglycone by carbon-carbon bond (*C*-glycosidic bond). *C*-glycosides were distributed broadly among plants, insects and microorganisms. For example, puerarin from "*Pueraria montana* var. lobata (kuzu)", mangiferin from "*Mangifera indica* (mango)"and carminic acid, which is used all over the world as a red pigment for food industry, were reported. *C*-glycosidic bond is more stable than other glycosidic linkages against high temperature and low pH. Moreover, no glycosidases can hydrolyze the *C*-glycosidic bond. In this conference, we will present the first step of *C*-glycoside metabolism in soil microorganisms.

C-glycoside, metabolism, microorganism

発表責任者：小林達彦（sec.mmb.tsukuba@gmail.com）

講演番号：2A01-04
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 09:00～ ミーティングルーム A

土壌微生物によるチアミン代謝

Metabolism of thiamine by soil microorganism

○熊野 匠人、室本 亮介、橋本 義輝、小林 達彦（筑波大生命）
○takuto kumano, Ryosuke Muromoto, Yoshiteru Hashimoto, Michihiko Kobayashi (Univ. of Tsukuba)

チアミンは生体内においてチアミン 2 リン酸として解糖系酵素の補酵素として働き、不足すると脚気になるビタミンの一種である。チアミンはチアミナーゼ（チアミナーゼ II）によって 4-メチル-5-β-ヒドロキシエチルチアゾールと 4-アミノ-5-ヒドロキシメチル-2-メチルピリミジンに分解されることが知られている。しかし、それらの代謝産物がどのように分解されるかについて、1960 年代に土壌微生物による推定代謝経路の報告があるものの、未だ酵素・遺伝子レベルでは不明である。そこで本研究では、微生物のチアミン代謝酵素・遺伝子を明らかにすることを目的とした。まず、チアミンを単一炭素源とする液体培地を用い集積培養することでスクリーニングを行い、チアミンを資化することのできる微生物を単離することができた。次に、それらの単離した微生物を再度チアミン単一炭素源液体培地で培養し、LC-MS により代謝産物の同定を試みた。その結果、代謝産物を複数検出することができ、土壌中におけるチアミン分解経路の一部を明らかにすることができた。

Thiamine is a vitamin working as a co-factor thiamine pyrophosphate in the glycolysis. Lack of thiamin causes the beriberi disease. Thiamine is hydrolyzed by thiaminase into thiazole and pyrimidine moiety. Thiaminases are reported from many kinds of living organisms, on the other hand, further metabolizing enzymes, which degrade thiazole and pyrimidine moiety, have never been identified. We present a part of thiamin metabolic pathway in a soil microorganism.

thiamine, metabolism, microorganism

発表責任者：小林達彦（sec.mmb.tsukuba@gmail.com）

講演番号：2A01-05
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 09:00～ ミーティングルーム A

Screening for biotransforming bacteria to produce Cycloastragenol from Astragaloside IV

Shigenobu Kishino[1], ○Daniel Makoto Takeuchi[1], Yuuki Ozeki[2], Hiroyuki Fukami[2], Jun Ogawa[1]
([1]Kyoto University Graduate School of Agriculture, [2]Kobayashi Pharmaceutical Co.)

Introduction: It has been established that plant derived compounds found in herbal medicines are used widely around the world. However, these compounds have varying effects on each individual due to the metabolism of the compound in the intestinal system by one's unique intestinal flora [1)]. Unlike pharmaceutical drugs where the active ingredients are determined, herbal medicines are administered in a relatively crude form such as plant extracts or tea. Astragaloside IV (AIV) is a triterpene saponin and the main constituent of *Astragalus membranaceus*, one of the fundamental herbs used in Chinese traditional medicine. AIV itself has effects of anti-inflammatory and anti-oxidative properties. However, it has poor bioavailability when administered orally due to its chemical structure and size. Cycloastragenol (CAG), an aglycone of AIV, has shown to be much more bioavailable due to its ability to passively diffuse through the epithelial wall of the intestines compared to AIV. CAG has also shown to be a relatively potent telomerase elongator and activator, which play a vital role in immune response and anti-aging [2)]. There is evidence that AIV is broken down into CAG in the intestines of rats [3)]. This study focuses on finding specific bacteria that can biotransform AIV to CAG.

Method and Results: 46 strains of intestinal bacteria derived from humans were screened in an anaerobic environment. AIV was used as a substrate to observe any glycolysis of the compound. The resting cell reaction of 13 bacteria strains and the analysis by HPLC and LCMS showed that bacteria can metabolize AIV to CAG and its intermediate. Furthermore, the screening showed that all 7 strains that produced CAG through the intermediate with the xylose removed were derived from the bifidobacteria genus. A secondary screening using a resting cell reaction of 38 strains of bifidobacteria showed 12 positive strains showing metabolism of AIV. Three strains showed complete metabolism of AIV to mainly the xylose cleaved intermediate Brachyoside B and some CAG. Under the selected screening conditions, the results suggest that the positive bifidobacteria have a preferential metabolic pathway of removing the xylose and eventually removing the glucose to produce CAG from AIV.

Reference: 1) Kobashi et al. *Biosci. Microflora.* (1997);16:1–7 **2)** Fauce et al.*J Immunol*. (2008);181(10):7400-7406. **3)** Jin et al. J Agric Food Chem. (2015) Jul 8;63(26):6084-93.

Bifidobacterium, aglycone, gut bacteria

発表責任者：岸野重信（kishino.shigenobu.3e@kyoto-u.ac.jp）

講演番号：2A01-06
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 09:00～ ミーティングルーム A

出芽酵母のプロテインキナーゼ A は、複合スフィンゴ脂質生合成破綻によって活性化される HOG 経路を負に制御する

Protein kinase A negatively regulates the HOG pathway under impaired biosynthesis of complex sphingolipids in budding yeast

○瓜田 敦哉[1]、柳瀬 由起美[1]、石橋 洋平[2]、谷 元洋[1] ([1]九州大理、[2]九州大農)
○Atsuya URITA[1], Yukimi YANASE[1], Yohei ISHIBASHI[2], Motohiro TANI[1] ([1]Fac. of Sci, Kyushu Univ., [2]Fac. of Agri, Kyushu Univ.)

複合スフィンゴ脂質は、真核生物の正常な生育に必須な膜脂質である。その生合成破綻は、広範囲に及ぶ細胞機能の異常を引き起こし、重篤な場合は死に至る。出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の Aur1 は、セラミド (複合スフィンゴ脂質の疎水性部)に親水性頭部を付加して複合スフィンゴ脂質に変換する IPC 合成酵素で、*AUR1* 発現抑制により複合スフィンゴ脂質の生合成低下が生じると強力な生育阻害が誘導される。本研究では、プロテインキナーゼ A (PKA)の活性化を引き起こす遺伝子変異が、*AUR1* 発現抑制による生育阻害を促進することを明らかにした。更に、PKA 過剰活性化による生育阻害促進効果を抑制できるマルチコピーサプレッサー遺伝子の探索を行い、複合スフィンゴ脂質生合成破綻に対する救済経路として最近我々が同定した高浸透圧ストレス応答経路 (HOG 経路)の MAPKK をコードする *PBS2* 遺伝子を同定した。このことより、*AUR1* 発現抑制による HOG 経路の活性化に PKA が影響を与えていることが考えられた。PKA の過剰活性化は、*AUR1* 発現抑制下で起きる Hog1 (HOG 経路の MAPK)のリン酸化および HOG 経路下流の転写応答を抑制することが明らかになった。このことから、PKA は複合スフィンゴ脂質生合成破綻下で HOG 経路の抑制に寄与することが判明した。一般的に、非ストレス条件下での HOG 経路の過剰活性化は、細胞毒性を引き起こすことが知られているため、PKA は複合スフィンゴ脂質破綻下で、HOG 経路の活性の適切な調節をしている可能性が示唆された。

Complex sphingolipids are essential component of eukaryotic biomembranes, and the metabolic defect causes various cellular dysfunctions. In this study, we found that, in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, mutations causing hyperactivation of Protein Kinase A (PKA) enhance growth defect caused by repression of *AUR1* encoding complex sphingolipid biosynthesis enzyme. Screening of multicopy suppressor genes revealed that overexpression of *PBS2* encoding MAPKK of the HOG pathway can suppress the effect of the hyperactivation of PKA on growth inhibition due to the *AUR1* repression. Furthermore, it was found that PKA is involved in suppression of activation of the HOG pathway under the *AUR1*–repressive conditions. Previously, we demonstrated that the HOG pathway is involved in rescue of cell growth under impaired biosynthesis of complex sphingolipids, and thus it was suggested that PKA may be involved in proper regulation of activity of the HOG pathway under the *AUR1*–repressive conditions.

sphingolipid, yeast, protein kinase a

発表責任者：谷　元洋（tani@chem.kyushu-univ.jp）

講演番号：2A01-07
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 09:00～ ミーティングルーム A

出芽酵母の複合スフィンゴ脂質構造多様性破綻による環境ストレス耐性能低下とその補填機構
Impairment of environmental stress tolerance due to loss of structural diversity of complex sphingolipid and its compensation mechanism in budding yeast
○古賀 綾乃、高山 千廣、瓜田 敦哉、谷 元洋（九州大理）
○Ayano KOGA, Chihiro TAKAYAMA, Atsuya URITA, Motohiro TANI (Kyushu Univ.)

複合スフィンゴ脂質は生体膜の基本骨格である脂質二重層の主要成分の一つであり、真核細胞の生育において必須な脂質である。複合スフィンゴ脂質には多彩な構造バリエーションがあり、この多様性が複合スフィンゴ脂質の多機能性を生み出していると考えられているが、その詳細は殆ど明らかになっていない。出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* では、複合スフィンゴ脂質は 15 種類のサブタイプに分類される。即ち、疎水性部のセラミドは A, B, B', C および D タイプの 5 種類、親水性頭部構造の違いで IPC、MIPC、$M(IP)_2C$ の 3 種類に分類される。本研究では、複合スフィンゴ脂質の構造多様性と生理機能の連関性を総合的に理解することを目的として、複合スフィンゴ脂質構造多様性破綻ライブラリー（スフィンゴ脂質代謝酵素の欠損を組み合わせ、様々な複合スフィンゴ脂質サブタイプが抜け落ちた計 11 種類の変異株ライブラリー）を作製し、それらのストレス耐性能の評価を行った。その結果、MIPC, $M(IP)_2C$ が生合成できず複合スフィンゴ脂質が IPC のみとなった変異株は、高温、高浸透圧、細胞壁およびアルカリストレスに対して高感受性を示し、この高感受性は IPC の A タイプしか存在しない変異株でさらに促進されることが明らかになった。また、IPC-A のみの変異株では、広範囲のストレス耐性獲得に寄与するジェネラルストレス応答の転写因子である Msn2, Msn4 が恒常的に活性化されていることを見出した。さらに、この変異株の通常の培養条件における生育速度、および各ストレス対する耐性能は、*MSN2/4* 欠損によって顕著に低下することが確認された。これらの結果より、酵母は複合スフィンゴ脂質の構造多様性が破綻すると、種々の環境ストレスに対する耐性能低下を示す一方で、Msn2/4 の恒常的活性化を誘導することで正常な生育を維持しようとしていることが示唆された。

Complex sphingolipids are essential component of eukaryotic biomembranes. Complex sphingolipids have enormous structural diversity, and the multiple biological functions of complex sphingolipids are thought to be due to their structural diversity. In the yeast *Saccharomyces cerevisiae,* complex sphingolipids can be classified into 15 subtypes. To investigate relationship between structural diversity and biological functions of complex sphingolipids, in this study, we created complex sphingolipid structural diversity disruption yeast library. By using this library, it was found that limitation of the structural diversity causes hypersensitivity to various environmental stresses. Furthermore, we also found that, in a mutant strain having only one complex sphingolipid species, constitutive activation of Msn2/4, general stress-responsive transcriptional regulators, occurs, and Msn2/4 are involved in maintenance of normal growth in the complex sphingolipid mutant.

sphingolipid, stress response, yeast

発表責任者：谷元洋（tani@chem.kyushu-univ.jp）

講演番号：2A01-08
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 09:00～ ミーティングルーム A

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* における翻訳後修飾を介した一酸化窒素の生理的役割の解明

Elucidation of the Physiological Role of Nitric Oxide *via* Post-translational Modification in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*

○示野 誠也、那須野 亮、高木 博史（奈良先端大・バイオ）
○Seiya SHINO, Ryo NASUNO, Hiroshi TAKAGI (NAIST)

一酸化窒素（NO）は様々な生物種において多くの生命現象に関わるシグナル伝達物質である。NO による生理機能の作用機序の一つとして、システイン残基特異的な翻訳後修飾（PTMs）である *S*-ニトロソ（SNO）化が知られている。近年、モデル低分子化合物を用いた解析から、SNO 化化合物がグルタチオンと反応し *S*-グルタチオン（SGA）化化合物へと変換されることが報告された。このような PTMs は酵素の活性やタンパク質の安定性に関与することで生理機能を制御している。高等生物のモデルであり、発酵産業上重要な酵母 *Saccharomyces cerevisiae* では、NO の生理的役割や作用機序には不明な点が多い。本研究では、酵母における PTMs を介した NO の生理機能に着目し、種々の解析を行った。

酵母細胞由来のタンパク質抽出液に NO 処理を行い、SNO 化タンパク質の検出手法であるビオチンスイッチ法に供した結果、NO 処理依存的にビオチン化、即ち SNO 化タンパク質が増加していた（*in vitro*）。一方、NO 処理行った酵母細胞から調製したタンパク質抽出液においては、NO 処理に伴う SNO 化タンパク質の有意な増加は見られなかった。そこで、SGA 化タンパク質を解析したところ、NO 処理依存的に SGA 化タンパク質が増加していた（*in vivo*）。これらの結果から、酵母においては NO 処理依存的なタンパク質の SNO 化を介して SGA 化が誘導され、SGA 化が酵母の生理機能に関与する可能性が考えられた。

Nitric oxide (NO) is an important signaling molecule in many organisms. NO is involved in physiological events *via* a post-translational modification （PTMs）, including *S*-nitrosylation（SNO）. It was recently reported that SNO is chemically converted into *S*-glutathionylation（SGA）in the presence of glutathione. In this study, we analyzed NO-dependent PTMs in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. When the protein extract was treated with NO, many proteins were detected as SNO proteins（*in vitro*）. On the other hand, when cells were exposed to NO, the intracellular SNO proteins did not increase. Interestingly, the intracellular SGA level was elevated by NO-treatment of cell（*in vivo*). From these results, we hypothesize that conversion of SNO into SGA is important for exerting physiological functions in NO signaling in yeast cells.

Saccharomyces cerevisiae, Nitric oxide, Post-translational modification

講演番号：2A01-09
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 09:00～ ミーティングルーム A

窒素飢餓ストレス応答の制御による酵母の分岐鎖アルコール耐性の向上と耐性機構の解明
Improvement of tolerance to branched-chain alcohol in yeast by regulating nitrogen starvation stress response and clarification of mechanism for improved tolerance
○黒田 浩一[1]、渡邉 幸夫[1]、Gerald R. Fink[2]、Gregory Stephanopoulos[3]、植田 充美[1]、Jose L. Avalos[4]
([1]京大院農、[2]Whitehead Institute for Biomedical Research、[3]MIT、[4]Princeton University)
○Kouichi Kuroda[1], Yukio Watanabe[1], Gerald R. Fink[2], Gregory Stephanopoulos[3], Mitsuyoshi Ueda[1], Jose L. Avalos[4] ([1]Kyoto Univ., [2]Whitehead Institute for Biomedical Research, [3]MIT, [4]Princeton Univ.)

【背景】 酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は元来エタノール耐性が高く、その生産量に優れている。一方、炭素数が 2 つ多いブタノール類に対してはこのような高い耐性は見られず、エタノールとは全く異なる生理的作用を示すことが予想される。優れたバイオ燃料の 1 つであるイソブタノールの高生産を実現するうえで、細胞自体の耐性強化が重要である。しかし、イソブタノール耐性を大きく向上させた例やイソブタノールによる生育阻害機構についての知見は乏しい。本研究では、酵母のイソブタノール耐性を向上するとともに耐性機構の解明を試みた。
【方法と結果】 酵母 1 遺伝子破壊株ライブラリーをイソブタノール含有培地にて生育させ、破壊によりイソブタノール耐性に大きな影響を与える遺伝子群を網羅的に調べた。その結果、イソブタノール高感受性または高耐性を示す遺伝子破壊株を同定することができた。最も強い耐性を示した株では、窒素源カタボライト抑制に関わる転写因子が欠損しており、分岐鎖アルコール特異的に耐性が向上するという興味深い現象が見られた[1]。さらに、本耐性株と野生株を用いた比較トランスクリプトーム解析により、耐性機構およびイソブタノールによる細胞生育阻害の新たな分子機構を明らかにすることができた[1]。

Yeast *Saccharomyces cerevisiae* is originally tolerant to ethanol, and its productivity is high. In contrast, such tolerance is not found in the case of butanols. There are little reports that improved isobutanol tolerance and clarified the mechanism underlying growth inhibition by isobutanol in yeast. In this study, we attempted to enhance isobutanol tolerance and understand the tolerance mechanism in yeast. We performed genome-wide screenings on the *S. cerevisiae* gene deletion library to identify the genes whose deletion influences isobutanol tolerance. The deletion strain that lacks the transcription factor involved in nitrogen catabolite repression showed the improved tolerance specifically to branched-chain alcohols [1]. Furthermore, comparative transcriptome analyses revealed the mechanism for improved tolerance and the novel mechanism of growth inhibition by isobutanol [1].

[1] K. Kuroda et al., *Cell Systems*, 9, 534-547 (2019)

isobutanol tolerance, genome-wide screening, nitrogen catabolite repression

発表責任者：黒田浩一（kuroda.kouichi.6s@kyoto-u.ac.jp）

講演番号：2A01-10
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 09:00～ ミーティングルーム A

酵母におけるペントースリン酸回路とイソブタノール耐性との関連性

The relationship between the pentose phosphate pathway and isobutanol tolerance in yeast

○吉川 雄樹、那須野 亮、高木 博史 (奈良先端科学技術大学院大学)
○Yuki YOSHIKAWA, RYO NASUNO, HIROSHI TAKAGI (Nara Institute of Science and Technology Dividion of Biological Science)

【背景と目的】 高等生物のモデルとして、また種々の発酵・醸造食品の製造に重要な酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は、発酵生産過程で様々なストレスに曝されている。例えば、エタノールのような生産物がストレスの原因となる場合、生産量とともにストレスの強度が増加し、最終的に生産効率の低下を招いてしまう。そのため、有用物質の生産性向上を目指す上で、各種のストレス耐性機構の解明は重要な課題であり、酵母においては特にエタノールに関する研究が盛んに行われている。最近、分岐鎖アルコールであるイソブタノールに耐性を示す株が取得され、細胞に毒性を発揮する機構が明らかになった（Kuroda *et al., Cell Systems,* 2019)。この報告では、ペントースリン酸経路（PPP）の遺伝子破壊株はイソブタノールに感受性を示すが、詳細な機構は明らかになっていない。我々はイソブタノール耐性試験の結果から、PPP には新規な生理機能が存在し、イソブタノール感受性に影響を及ぼす可能性を見出した。本発表ではこれについて議論したい。

【方法と結果】まず、主な NADPH の産生経路である PPP の初発酵素であるグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ（G6PD)、および 6-ホスホグルコン酸デヒドロゲナーゼ（6PGD）の遺伝子破壊株をそれぞれ作製した。次に、イソブタノール含有培地を用いたスポットテストによって各菌株のストレス耐性を評価したところ、G6PD 遺伝子破壊株は野生型株と比較して顕著に生育が阻害された。しかしながら、PPP における NADPH 産生の代替経路として、$NADP^+$依存的なアルデヒドデヒドロゲナーゼ（ADH）遺伝子を過剰発現させたところ、生育速度が野生型株と同程度にまで回復した。一方で、6PGD 遺伝子破壊株も同様にイソブタノール感受性を示したが、ADH 遺伝子の過剰発現による生育阻害の回復は確認できなかった。これらのことから、PPP において 6PGD は NADPH 産生以外にも生理機能を有しており、イソブタノール耐性機構において重要な役割を担うことが示唆された。

The yeast *Saccharomyces cerevisiae*, which is important as a model for higher eukaryotes and also for the fermentation industry, is exposed to various stresses during the fermentation production process. Therefore, elucidation of stress tolerance mechanisms is an important issue for improvement of the productivity of useful substances. In this study, we found that the pentose phosphate pathway has a new physiological function, which is different from NADPH production, and may be involved in isobutanol sensitivity, based on the results of the mutant deficient in glucose-6-phosphate dehydrogenase and 6-phospho-gluconate dehydrogenase.

Yeast, Pentose phosphate pathway, Isobutanol

発表責任者：吉川　雄樹（y-yoshikawa@bs.naist.jp）

講演番号：2A01-11
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 09:00～ ミーティングルーム A

酵母 *Yarrowia lipolytica* における *n*-アルカンに対する転写応答機構の解析

Transcriptional response to *n*-alkane in the yeast *Yarrowia lipolytica*

○村山 怜子[1]、手崎 聡[1]、岩間 亮[1,2]、堀内 裕之[1,2]、福田 良一[1,2]([1]東大院・農生科、[2]東大　微生物連携機構)
○ Reiko MURAYAMA[1], Satoshi TEZAKI[1], Ryo IWAMA[1,2], Hiroyuki HORIUCHI[1,2], Ryouichi FUKUDA[1,2] ([1]Univ. of Tokyo, [2]CRIIM, UTokyo)

酵母 *Yarrowia lipolytica* は、*n*-アルカンなどの疎水性化合物を資化する高い能力を持つ酵母である。*Y. lipolytica* を *n*-アルカンを炭素源として培養すると、*n*-アルカンの酸化に関わるシトクロム P450 遺伝子 *ALK1* の転写が活性化される。*ALK1* の *n*-アルカンに対する転写応答には、*ALK1* プロモーター中の配列 Alkane Responsive Element 1 (ARE1) とそれに結合する転写活性化因子 Yas1 および Yas2 の複合体と転写抑制因子 Yas3 が関与する。これまでの研究より、*n*-アルカンの非存在下では Yas3p は核内に移行し Yas2p と結合して *ALK1* の転写を抑制するのに対し、*n*-アルカン存在下では Yas3p は小胞体に保持されるため Yas1p-Yas2p 複合体により *ALK1* の転写が活性化されること、Yas3p はホスファチジン酸やホスホイノシチドに結合することが明らかにされている(1)が、Yas3 の局在が *n*-アルカンに応答してどのように制御されているのかは未解明である。本研究では Yas3 の局在制御機構を明らかにすることを目的として、*n*-アルカンに対する応答に欠損を持つ変異株を単離し解析した。*ALK1* プロモーターに連結したレポーター遺伝子 *lacZ* を導入し、さらに Yas3 と EGFP の融合タンパク質と小胞体マーカーである Sec61 と DsRed の融合タンパク質を発現させた株を作製した。この株を変異原処理し、*n*-アルカン存在下でのレポーター遺伝子の発現と *n*-アルカンを炭素源とした培地での生育に欠損を示し、さらに *n*-アルカン存在下での Yas3-EGFP の小胞体局在に異常を示す変異株を 2 株単離した。これらの株の表現型の原因となる変異についてゲノムシーケンスにより解析を行ったので報告する。

(1) Fukuda, R., *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **77**, 1149-1154 (2013)

The yeast *Yarrowia lipolytica* has outstanding abilities to assimilate hydrophobic compounds, including *n*-alkanes. Transcription of *ALK1*, which encodes the cytochrome P450 involved in *n*-alkane oxidation, is upregulated when *Y. lipolytica* is cultured with *n*-alkane. The transcription of *ALK1* is regulated by transcription activators Yas1p and Yas2p and a transcription repressor Yas3p via Alkane Responsive Element 1 (ARE1) in *ALK1* promoter. In the absence of *n*-alkane, Yas3 is targeted to the nucleus and represses *ALK1* transcription through binding to Yas2. In contrast, in the presence of *n*-alkane, Yas3 is retained to the endoplasmic reticulum (ER) and *ALK1* transcription is activated by Yas1-Yas2 complex. Here, to clarify the mechanism to regulate the localization of Yas3 in response to *n*-alkane, we isolated and characterized mutant strains defective in the ER localization of Yas3 in the presence of *n*-alkane and in the transcriptional activation of *ALK1*.

Yarrowia lipolytica, *n*-alkane, Transcriptional repressor

発表責任者：福田良一（afukuda@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2A01-12
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 09:00～ ミーティングルーム A

Komagataella phaffii 転写活性化因子 Mxr1 のメタノール濃度依存性遺伝子発現制御における機能領域の解析

Analysis of functional domains of transcriptional factor Mxr1 responsible for methanol-induced gene expression in *Komagataella phaffii*

○井上 紘一、由里本 博也、阪井 康能（京大院農）
○Koichi Inoue, Hiroya Yurimoto, Yasuyoshi Sakai (Kyoto Univ.)

メタノール資化性酵母 *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*) では、メタノール濃度に応答してメタノール誘導性遺伝子の発現レベルは厳密に制御されており、その強力にメタノール誘導される遺伝子プロモーターを用いた異種タンパク質生産系は広く利用されている。我々はこれまでに、細胞表層でメタノール濃度の感知に寄与する Wsc1, Wsc3 を起点としたメタノール濃度情報が、メタノール誘導性遺伝子発現に必須の転写活性化因子 Mxr1 に伝達され、Mxr1 のリン酸化レベルがメタノール濃度に応じて変化することを前回大会で報告した。

本研究では Mxr1 におけるメタノール濃度依存的な遺伝子発現制御に重要な機能領域を同定するため、*mxr1Δ* 株において Mxr1 のドメイン欠失体発現株を種々作成し、メタノール誘導性 mRNA 量を測定した。Mxr1 全長 1155 アミノ酸のうち、中程のドメインが 0.1%以上の高濃度でのメタノール誘導性に重要であること、Mxr1 N 末端ドメインが 0.01%以下の低濃度でのメタノール誘導性に重要であると考えられた。これら領域のアミノ酸配列について、他のメタノール資化性酵母が持つ *MXR1* パラログとの比較により、メタノール資化性酵母間で保存されたアミノ酸領域を複数見出した。現在は、これらのアミノ酸領域の欠失がメタノール濃度依存的な遺伝子発現に与える影響や Mxr1 の核局在への影響を調べている。

Methylotrophic yeasts are capable of growth on methanol as the sole carbon and energy source. They have been used as hosts for heterologous protein production, which is achieved with their strongly and tightly regulated methanol-induced promoters. When methylotrophic yeasts grow on methanol, methanol-induced genes (e.g., *AOX1, DAS)* in *K. phaffii (P. pastoris)* are expressed depending on the methanol concentration in the medium. Mxr1, a transcription factor, is necessary for methanol-induced gene expression and its phosphorylation level is changed corresponding to the methanol concentration. In this study, the functional domains on Mxr1 for methanol-dependent gene expression were investigated. As the results of quantification of transcripts of methanol-induced genes, we identified domains of Mxr1, which were involved in methanol concentration-dependent gene expression, and several of them were found to be conserved among several species of methylotrophic yeasts.

Methylotrophic yeast, Transcription factor, Functional domains

講演番号：2A01-13
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 09:00～ ミーティングルーム A

黄麹菌 *Aspergillus oryzae* が有するカルボキシペプチダーゼ遺伝子 *ocpO*, *ocpA* の転写制御領域の解明

Study on transcriptional regulatory regions of the carboxypeptidase-encoding genes *ocpO*, *ocpA* in *A. oryzae*

○沼澤 里佳、山形 洋平（農工大院応生化）
○Rika NUMAZAWA, Youhei YAMAGATA (Tokyo Univ. of Agriculture and Technology)

【背景・目的】黄麹菌 *Aspergillus oryzae* が有する OcpO, OcpA はタンパク質やペプチドの C 末端側からアミノ酸を遊離するセリンタイプカルボキシペプチダーゼ（CPase）である。液体培地では OcpO が、固体培地（小麦ふすま培地）では OcpA が生産される。この培養条件特異的な CPase 生産は転写制御によるものと考えられた。そこで本研究では *ocpO*, *ocpA* の転写制御機構の解明を目的とした。
【方法・結果】転写因子結合配列（*cis*-element）が存在する領域を絞り込むため、*ocpO, ocpA* のプロモーター領域を段階的に欠損させた遺伝子組み換え株を用いてレポーターアッセイを行った。これにより *ocpO* のプロモーター領域の上流 1000 ~ 500 bp に転写を上方制御する因子の結合領域が、上流 2000 ~ 1500 bp に転写を下方制御する因子の結合領域が存在することが示唆された。一方、*ocpA* ではプロモーター領域の上流 1000 ~ 500 bp に転写を上方制御する因子の結合領域が、上流 1500 ~ 1000 bp に転写を下方制御する因子の結合領域が存在することが示唆された。今後ゲルシフトアッセイを行うなどして転写因子結合領域の絞り込みを行う。

OcpO and OcpA are serine-type carboxypeptidases (CPases) in Aspergillus oryzae, that continuously release amino acid residues from the C-terminal side of proteins and peptides. OcpO is produced in liquid medium, and OcpA is produced in solid medium. This culture condition-specific CPase production was suggested to be due to transcriptional regulation.
In order to clarify the mechanism of transcription control of the CPase encoding genes, we have tried to determine the transcription factor binding sites in each promoter region by reporter assays. It was performed using mutant strains in which the promoter region of *ocpO* and *ocpA* gradually truncated, respectively. In *ocpO*, a *cis*-element of a factor that promote transcription was located from -1000 to -500 bp upstream of the promoter region, while a *cis*-element of a factor that repress transcription was located from -2000 to -1500 bp upstream of the promoter region. On the other hand, in *ocpA*, a *cis*-element of a factor that promote transcription was located from -1000 to -500 bp upstream of the promoter region, while a *cis*-element of a factor that repress transcription was located from -1500 to -1000 bp upstream of the promoter region.

Aspergillus oryzae, carboxypeptidase, *cis*-element

発表責任者：沼澤里佳（s199243q@st.go.tuat.ac.jp）

講演番号：2A01-14
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 09:00～ ミーティングルーム A

酵母コドン最適化グルコアミラーゼ遺伝子に存在する発現抑制配列の解析

Expression-suppressing sequence present in a yeast codon-optimized glucoamylase gene

○荒牧 孝弘[1]、菊田 浩希[1]、赤田 倫治[1,2,3]、星田 尚司[1,2,3] ([1]山口大院 創成科学・化学、[2]山口大中高温微生物セ、[3]山口大生命医工学セ)
○Takahiro ARAMAKI[1], Hiroki KIKUTA[1], Rinji AKADA[1,2,3], Hisasi HOSIDA[1,2,3] ([1]Yamaguchi Univ.,Dev.Appl.Chem., [2]Yamaguchi Univ.,RC-TMR, [3]Yamaguchi Univ.,YUBEC)

組換えタンパク質の発現量を高める方法の一つとして、コドンの最適化が挙げられる。しかし、酵母コドン最適化ルシフェラーゼ遺伝子 yCLuc では酵母での発現量が大幅に抑制されていた。そこで本研究では、yCLuc と同様にコドンの最適化により発現抑制を起こす他の遺伝子を探索し、その配列を解析することにした。グルコアミラーゼ遺伝子を酵母コドンに最適化した遺伝子 yRo*GLU1* を作製した。これまでに、yCLuc における発現抑制はイントロンにより解除されることを明らかにしたことから、イントロン存在下および非存在下でグルコミラーゼ活性を測定した。その結果、イントロン非存在下では活性はほとんど見られず、存在下でだけ活性が見られた。yRo*GLU1* の発現に影響する配列を明らかにするために、yRo*GLU1* の前半の配列を 1～300 bp、301～600 bp、601～900 bp に分け、これらの領域を酵母の人工遺伝子合成法により、コードするアミノ酸は同じで塩基配列をランダムに多数構築した。形質転換体の活性を定性的に比べると、1～300 bp を改変した場合だけ活性の高い株を 6 株得られた。最も高い活性を示した改変株 mc8 と yRo*GLU1* を組み合わせた複数のキメラ遺伝子を構築し、抑制配列を同定した。その結果、yRo*GLU1* の 40～48 bp を mc8 の配列に変えるだけで mc8 と同程度のグルコアミラーゼ活性を示した。この領域の両配列間の違いは 5 塩基のみであり、この 5 塩基が発現に重要であることがわかった。

Codon optimization is one of the methods to increase recombinant protein expression. However, the expression of a yeast codon-optimized luciferase gene, yCLuc was significantly repressed in yeast. In this study, we searched other genes whose expression is repressed by codon optimization. As a result, the expression of a yeast codon-optimized yRo*GLU1* was almost zero in yeast. Several regions in the first half of yRo*GLU1* was randomly substituted using yeast artificial gene synthesis method. A qualitative measurement of activities of the transformants showed that six strains obtained from only the 1-300 substitution showed higher activities. We constructed several chimeric genes by combining the most active modified strain mc8 with yRo*GLU1*. As a result, substitution of 40-48 bp in yRo*GLU1* with the mc8 sequence showed the same level of glucoamylase activity as mc8. The difference between the two sequences in this region was five nucleotides, indicating that these five nucleotides were important for expression of yRo*GLU1*.

Codon optimization, Glucose amylase, Suppressed expression

講演番号：2A01-15
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 09:00～ ミーティングルーム A

メタノール誘導性転写因子 Mpp1 のプロモーター領域の解析

Analysis of promoter region in methanol-induced transcription factor Mpp1

○岩瀬 公佑、井上 紘一、由里本 博也、阪井 康能（京大院農）
○Kosuke Iwase, Koichi Inoue, Hiroya Yurimoto, Yasuyoshi Sakai (Kyoto Univ.)

メタノール資化性酵母は、メタノールによって強力かつ特異的に誘導される遺伝子プロモーターを有し、異種遺伝子発現系における宿主として広く利用されている。*Candida boidinii* では、これまで同定したメタノール誘導性遺伝子発現に関与する転写活性化因子のうち、Mpp1 のみメタノールにより発現が誘導され、他のメタノール誘導性遺伝子発現に必須であるため、メタノール誘導初期において中心的な役割を果たすと考えられた。これまでに Mpp1 の発現制御機構の解明を目的として、*MPP1* プロモーター領域の欠損解析を行い、転写活性化領域 (Upstream Activating Sequence; UAS)を 2 箇所同定し、UAS1、UAS2 と名付けた。本研究では、*MPP1* プロモーターの転写活性化における各 UAS 領域の十分性を検討した。各 UAS 領域を構成的に発現する *ACT1* 遺伝子プロモーターのコア領域上流に配置し、酸性ホスファターゼ（ScPho5）をレポーターとしてプロモーター活性の測定を行ったところ、メタノール培養時におけるプロモーター活性が各 UAS 領域の付加によって有意に上昇した。この結果から、各 UAS 領域が転写活性化に十分な領域であることがわかった。

Methylotrophic yeasts have strong methanol-induced promoters and are commonly used as hosts for heterologous gene expression. In the methylotrophic yeast *Candida boidinii*, Mpp1 is a transcriptional activator induced by the presence of methanol. To identify the regulatory mechanism of Mpp1 gene expression, *MPP1* promoter deletion analyses were performed, and two regions, UAS1 and UAS2, were identified as upstream activating sequences (UASs). To confirm the sufficiency of each UAS, the activities of artificial promoters which have UASs fused with the core region of the constitutive *ACT1* promoter were determined. As a result, activities of these promoters were significantly increased by methanol, and UAS1 and UAS2 were revealed to be sufficient for function as transcriptional activating regions.

methylotrophic yeast, transcription factor, *Candida boidinii*

講演番号：2A01-16
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 09:00～ ミーティングルーム A

ICE_{KKS102}*4677*の接合伝達を制御する遺伝子発現制御機構

Regulatory mechanism controlling ICE_{KKS102}*4677* transfer in PCB-degrader *Acidovorax* sp. KKS102

○松本 哲、永田 裕二、大坪 嘉行（東北大生命）
○Satoshi MATSUMOTO, Yuji NAGATA, Yoshiyuki OHTSUBO (Tohoku Univ.)

Acidovorax sp. KKS102 株は PCB 分解細菌であり、当該分解遺伝子群(*bph* 遺伝子群)は染色体上にある integrative and conjugative element(ICE_{KKS102}*4677*)に存在している。*bph* 遺伝子群の直下流には LysR ファミリーに属する転写因子をコードすると推定される *traR* 遺伝子が存在し、本研究では *traR* 遺伝子の機能解明を目的として以下の解析を行なった。

まず、*traR* 発現誘導によって接合伝達体が高頻度で取得された。また *traR* 誘導時の RNA-seq 解析を行ったところ、推定 *xis* 遺伝子の転写量増加を見出した。Xis は ICE を染色体から切り出して環状化するのを補助するタンパク質であり、*xis* 遺伝子上流には、LysR 結合モチーフが見出された。次に、*traR* 誘導条件における ICE の切り出し頻度を qPCR 法で測定した結果、50 倍程度の上昇が観察された。以上の結果から、*traR* は *xis* 遺伝子の転写を活性化し、ICE 切り出し頻度の上昇させることで接合伝達を活性化する因子であることが示唆された。

traR が *bph* 遺伝子群と同一転写単位に含まれるか検討するために、*bph* 遺伝子群のプロモーター(pE プロモーター)を *tac* プロモーターに置換し、*traR* 遺伝子の転写量を qRT-PCR 法により解析した。その結果 *traR* 遺伝子の転写量が増加したことから、*traR* は *bph* 遺伝子群と同一転写単位に含まれることが示唆された。pE プロモーターがビフェニル存在下で活性化することを踏まえると、ICE_{KKS102}*4677* の接合伝達は、*bph* 遺伝子群が発現誘導される環境下で上昇することが示唆される。*traR* は ICE の利己的挙動を増強するとも捉えられ興味深い。

ICE_{KKS102}*4677* found in Acidovorax sp. KKS102 is an integrative and conjugative element and carries *bph* operon for PCB/biphenyl degradation, which is transcribed from pE promoter. In this study, we focused on *traR* gene, which is located downstream of the *bph* operon in the same direction and encodes putative LysR-type transcriptional regulator.

Overexpression of *traR* increased the conjugation frequency, and the proportion of the excised form to the integrated form of ICE. RNA-seq analysis revealed increased *xis* transcript, whose protein product might enhance ICE excision. Replacing the pE promoter with the *tac* promoter increased the *traR* transcription level, suggesting that the *traR* transcription is under the control of the pE promoter. These data indicated that *traR* activates the ICE_{KKS102}*4677* conjugation by increasing the circular form by activating *xis* trancription. The role of TraR to induce the transfer under situations where the cargo genes give a fitness advantage to the host might have promoted the dissemination of this ICE.

integrative and conjugative elements, conjugation, gene expression

発表責任者：松本　哲（s.matsumoto@ige.tohoku.ac.jp）

講演番号：2A01-17
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 09:00～ ミーティングルーム A

Clostridium perfringens の *agrBD* ノックアウト変異株におけるペリクル状バイオフィルム形成の分子機構の解明

Elucidation of molecular mechanism for the pellicle biofilm formation in *agrBD*-knockout mutant of *Clostridium perfringens*

○伊藤 瞭[1]、重岡 愛莉[1]、本田 香代[1]、安達 桂香[1]、大谷 郁[2]、中山 二郎[1] ([1]九州大農、[2]東海大医)
○Ryo ITO[1], Eri SIGEOKA[1], Kayo HONDA[1], Keika ADACHI[1], Kaori OHTANI[2], Jiro NAKAYAMA[1] ([1]Kyushu Univ., [2]Tokai Univ.)

クオラムセンシング（QS）とは、細菌の細胞密度に依存した、シグナル分子によって遺伝子発現を制御する機構である。*Clostridium perfringens* は、perfringolysin A の発現を誘導する QS シグナルとして AIP_{Cp}（autoinducing peptide）を分泌し、病原性の調整を行っている。*agrBD* ノックアウト変異株である *C. perfringens* TS230 は AIP_{Cp} を生産できないため、perfringolysin A 生産を自己誘導できない。しかしながら、TS230 株がペリクル状バイオフィルムを形成することが確認された。本研究では、*C. perfringens* のバイオフィルム形成の分子機構を解明することを目的とした。RNA シーケンス解析から得られた配列から、*agrBD* ノックアウトによって AI-2 合成遺伝子と膜関連酵素遺伝子の発現が増加し、diguanylate cyclase の発現が減少することが明らかになった。また、バイオフィルム形成機構は、agr QS 制御系とは独立しており、cyclic-di-GMP を媒介した制御系によって制御されている可能性が示唆された。

【Introduction】Quorum sensing (QS) is the bacterial cell density-dependent mechanism for regulating gene expression using signal molecules. *Clostridium perfringens* secretes autoinducing peptide (AIP_{Cp}) as the QS signal that triggers the expression of perfringolysin A genes when its cell density reaches a certain level, resulting in the coordination of its pathogenicity. *C. perfringens* TS230, an *agrBD* insertional knockout mutant, is unable to produce AIP_{Cp}, therein dose not self-induced the production of perfringolysin but forms pellicle biofilm formation. This study aims to address the molecular mechanism of biofilm formation.

【Materials and Methods】*C. perfringens* str. 13 (wild type) and TS230 (the AIP_{Cp}-negative strain) was cultured with 500 nM of AIP_{Cp}. RNA was extracted from the cultured bacteria cells and subjected to top-down RNA sequencing (RNA seq). In addition, the time course of *pfoA* and genes related to biofilm was quantified by reverse-transciption-qPCR.

【Result and Discussion】The RNA sequences indicated that the *agrBD* knockout resulted in the increase of expression of AI-2 synthetic genes and a membrane associated enzyme gene annotated soltase and the great decrease of diguanylate cyclase gene. The biofilm phenotype of TS230 was not changed by the addition of synthetic AIP_{Cp}, while *pfoA* expression was recovered by AIP_{Cp} It is concluded that the biofilm formation phenotype was independent of the *agr* QS system but may be regulated by cycli-di-GMP mediated regulatory system.

Quorum Sensing, *Closridium perfringens*, biofilm formation

発表責任者：中山　二郎（nakayama@agr.kyushu-u.ac.jp）

講演番号：2A03-01
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 10:00～ ミーティングルーム A

γ-Hexachlorocyclohexane（HCH）汚染土壌のメタゲノム解析
Time-series metagenomics of the γ-HCH-polluted soil
○加藤 広海、田中 彩美、永田 裕二（東北大・院生命）
○Hiromi KATO, Ayami Tanaka, Yuji Nagata (Tohoku Univ.)

有機塩素系殺虫剤γ-hexachlorocyclohexane (γ-HCH) は環境中での残留性が高く人体に有害であることから環境汚染物質として問題となっている。最も研究が進んでいるγ-HCH 分解菌 *Sphingobium japonicum* UT26 株では、γ-HCH をβ-ketoadipate 経由で分解する遺伝子群（*linA-linJ*）が明らかにされ、それら遺伝子群の獲得には可動性遺伝因子が重要な役割を果たしてきたと考えられている。一方で γ-HCH 分解に必要な遺伝子群が環境遺伝子プールの中でどのように生まれ維持されているのか、さらに分解菌の祖先種がどのようにそれら遺伝子を取り込んで分解菌として進化してきたのか、これらの謎を解き明かすには分解細菌株の比較ゲノムに加えて、γ-HCH 汚染環境の遺伝子プールの時間的変動を観察する必要がある。そこで本研究ではγ-HCH 連用圃場のメタゲノム解析を実施した。UT26 株の分離源であるγ-HCH 連用圃場は、現在では HCH が検出限界以下にまで減少している。この土壌をγ-HCH で 1000 ppm（TH-L） および 1%（TH-H）で再汚染し、適宜土壌の γ-HCH 濃度測定、ショットガンメタゲノム （Illumina Novaseq, paired-end 150, 15 Gbase）、ならびに 16S rRNA amplicon 解析を実施した。培養 157 日目において TH-L で 90%以上の HCH 分解が見られたため、再汚染前と再汚染 157 日目のサンプルでメタゲノム解析を実施した結果、再汚染前では *linA* が約 3 億リード中 1 リードしか検出されず、他の *lin* 遺伝子群は検出できなかったことから、再汚染前ではγ-HCH がない状態が長期継続したため、極めて低頻度で *lin* 遺伝子が維持されていたと思われる。一方 157 日目の TH-L と TH-H では菌叢構造の変化が見られ、*Sphingobium, Rhodanobacter* および複数の *Actinobacteria* が高い増加率を示した。また一連の *lin* 分解遺伝子群が数百倍に増加し、HCH 添加によって分解菌が再度増殖した結果と思われる。これら分解遺伝子は UT26 株と極めて高い相同性を示したが、上流と下流代謝遺伝子の存在割合から UT26 株とは異なるゲノム構造を有する分解細菌の存在が示唆された。今後同汚染土壌から分離された複数の分解細菌株のゲノム比較を実施する予定である。

γ-Hexachlorocyclohexane (γ-HCH) is a recalcitrant man-made chlorinated pesticide that causes serious environmental problems. The degradation pathway of γ-HCH and responsible genes (*lin*) has been determined in a bacterial strain *Sphingobium japonicum* UT26. However, dynamics of *lin* genes in environmental gene pools is still unknown. In this study, we report time-series metagenomics of the γ-HCH-polluted soil, from which UT26 has been obtained.

γ-Hexachlorocyclohexane, soil, Time-series metagenomics

発表責任者：加藤広海（katee@ige.tohoku.ac.jp）

講演番号：2A03-02
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 10:00～ ミーティングルーム A

日本人とインドネシア人の乳幼児の腸内メタゲノム比較解析

Comparative metagenomic analysis of gut microbiome of Indonesian and Japanese infants

○清野 峻彦[1]、堀野 美里[1]、田中 優[1]、山田 拓司[2]、林 哲也[3]、後藤 恭宏[3]、加藤 聖子[3]、實藤 雅文[4]、諸隈 誠一[3]、小川 昌宣[4]、Endang Rahayu[5]、中山 二郎[1] ([1]九州大学院農、[2]東工大生命理、[3]九州大学院医、[4]九州大環境発達医学研究センター、[5]ガジャ・マダ大農工)
○ Toshihiko SEINO[1], Misato HORINO[1], Masaru TANAKA[1], Takuji YAMADA[2], Tetsuya HAYASHI[3], Yasuhiro GOTO[3], Kiyoko KATO[3], Masahumi SANEHUJI[4], Seiichi MOROKUMA[3], Masanobu OGAWA[4], Rahayu Endang[5], Jiro NAKAYAMA[1] ([1]Kyushu Univ., [2]Tokyo Institute of Technology, [3]Kyushu University, [4]Kyushu Uni., [5]Gadjah Mada Univ.)

出生後の腸内細菌叢は、授乳や離乳のみならず、様々な生活環境の影響を受け、無菌状態から複雑な形態へと発達していく。 本研究では、出産後の生育環境が腸内細菌叢の発達にどのような影響を与えるか解明するために、日本人とインドネシア人の乳幼児の腸内メタゲノム解析を行った。本研究では、日本人(n=48)、インドネシア人(n=36)の計 84 糞便サンプルより抽出した全細菌 DNA から、Illumina 社 HiSeq を用いてペアエンド・ショットガン解析を行うことで DNA 配列を決定した。そして、MG-RAST version 4.0.3 を用いて各サンプルの種レベルでの細菌組成と遺伝子機能情報を獲得した。その結果、まず両国とも離乳前は *Bif.longum* と *Bif.breve* が優勢であり、離乳後は *Bif.adolescentis* と *Bif.dentium* が優勢であった。インドネシア人において約半数で離乳後に Prevotella が優勢になることが確認された。また、日本人において特徴的に *Veillonellaceae* が離乳前から、*Clostridium bolteae, Clostridium difficile, Ruminococcus gnavus* が離乳後から有意に多くなっていた。機能遺伝子に着目すると、ガラクトース代謝遺伝子と一次胆汁酸代謝遺伝子が離乳前のインドネシア人乳児で有意に多く、リポ多糖生合成遺伝子が離乳前の日本人乳児で有意に多かった。以上の結果は、両国間における腸内環境の違いの要因を明らかにするためのさらなる研究の必要性を示唆している。

To address how growing environment affects the development of gut microbiota after birth, we performed comparative metagenomic study on the microbiome of Japanese and Indonesian infants. We collected 84 fecal samples from Japanese (n=48) and Indonesian (n=36) infants. The DNA sequences were obtained by shot-gun and paired-end sequencing using Illumina Hiseq genome sequencer. Subsequently, MG-RAST version 4.0.3 was used to obtain and analyze the composition of functional genes and bacteria composition at species level. As a result, in both country, domination by Bifidobacterium was observed under lactation. *Bif.longum* and *Bif.breve* was dominant in both countries, while *Bif.adolescentis* and *Bif.dentium* replaced after weaning. After weaning, *Prevotella* appeared especially in Indonesian while Bacteroides appeared as dominant in both countries. Also, it was found that *Veillonellaceae* from pre-weaned period and *Clostridium bolteae, Clostridium difficile,* and *Ruminococcus gnavus* after pre-weanged were more abundant in Japanese. At function level, galactose metabolism genes and primary bile acid metabolism genes were significantly more abundant in Indonesian infants, while lipopolysaccharide biosynthesis genes were significantly more abundant in Japanese infants. These results warrant further study to find factors leading the differences between the two countries.

metagenomic analysis, gut microbiota, functional gene

講演番号：2A03-03
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 10:00～ ミーティングルーム A

クエン酸高生産菌 *Aspergillus tubingensis* WU-2223L のドラフトゲノムの決定
Draft genome sequencing of *Aspergillus tubingensis* WU-2223L, a citric acid hyperproducer.
○吉岡 育哲[1]、高橋 弘喜[2,3,4]、楠屋 陽子[2]、矢口 貴志[2]、桐村 光太郎[1] ([1]早大・先進理工・応化、[2]千葉大・真菌センター、[3]千葉大・分子キラリティー研究センター、[4]千葉大・植物分子科学研究センター)
○Isato YOSHIOKA[1], Hiroki TAKAHASHI[2,3,4], Yoko KUSUYA[2], Takashi YAGUCHI[2], Kohtaro KIRIMURA[1] ([1]Dept. Appl. Chem., Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ., [2]Medical Mycology Research Center, Chiba Univ., [3]Molecular Chirality Research Center, Chiba Univ., [4]Plant Molecular Science Center, Chiba Univ.)

【背景と目的】
クエン酸は糸状菌 *Aspergillus niger* 群の菌株を用いた工業的発酵により生産されている。*A. niger* のクエン酸生産機構について概要は明らかになったが、その完全な解明には至っていない。本研究では、遺伝的背景を新たに探索するため、グルコース等の供与糖当たり 50% (w/w) 以上の収率でクエン酸を生産する *A. tubingensis* WU-2223L を供試菌としてそのドラフトゲノム配列を明らかにした。
【方法と結果】
演者らは、Illumina HiSeqX および Nanopore MinION シーケンサーを組合わせて WU-2223L 株のゲノム配列を決定した。WU-2223L 株の染色体ゲノムは 35 Mb から成り、*A. oryzae* の gene model を基に推定された 11,493 個のタンパクをコードする遺伝子を有している。また、32.4 kb から成る完全長のミトコンドリアゲノム配列も取得した。さらに、WU-2223L 株のゲノム scaffolds を近縁で染色体構造が既知の *A. luchuensis* NBRC4314 のものと比較し、各 Scaffold が 8 本の染色体を広範囲でカバーしており、一部では染色体転座を示唆する配列を見出した。以上より、演者らが取得した *A. tubingensis* WU-2223L の高精度のゲノム配列は、クエン酸生産機構の考察に利用可能であると考えている [1]。

Citric acid is produced by industrial fermentation using strains belonging to the group of *Aspergillus niger*. Although the overview of mechanisms concerning citric acid production has been revealed, complete understanding of these mechanisms has not been demonstrated. In this study, to consider the genetic backgrounds, we sequenced the draft genome of *A. tubingensis* WU-2223L, which produces citric acid with high yield (>50% (w/w) based on supplied carbohydrate), by hybrid assemble method using Illumina HiSeqX and Nanopore MinION. The chromosomal genome of strain WU-2223L (35 Mb) consisting of 11,493 protein-coding genes, which were annotated using *A. oryzae* gene model, and the complete mitochondrial genome (32.4 kb) were determined. Moreover, comparing genome of *A. luchuensis* NBRC4314, whose chromosomal structures are known, with genomic scaffolds of strain WU-2223L, revealed that each scaffold widely covered chromosomes I-VIII and that the chromosomal rearrangement could exist. Thus, we obtained the high-quality draft genome of citric acid hyperproducing strain applicable to elucidation of mechanisms concerning citric acid production [1].
[1] Yoshioka I. et al. Microbiol Resour Announc 2020;9; e00702-20.

Aspergillus niger (*Aspergillus tubingensis*), citric acid production, genome sequencing

発表責任者：桐村　光太郎（kkohtaro@waseda.jp）

講演番号：2A03-04
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 10:00～ ミーティングルーム A

シングルセルゲノム情報を用いた未培養環境細菌のコンプリートゲノムの獲得
Complete genome sequences of environmental bacteria constructed from single-cell genomes
○小川 雅人[1,2]、細川 正人[3,4]、西川 洋平[2]、柳澤 有祐[1]、佐伯 達也[3]、依田 卓也[3]、竹山 春子[1,2,4,5]
([1]早大院先進理工、[2]早大・産総研 CBBD-OIL、[3]bitBiome 株式会社、[4]早大ナノライフ創新研、[5]早大先進生命動態研)
○Masato KOGAWA[1,2], Masahito HOSOKAWA[3,4], Yohei NISHIKAWA[2], Yusuke YANAGISAWA[1], Tatsuya SAEKI[3], Takuya YODA[3], Haruko TAKEYAMA[1,2,4,5] ([1]Department of Life Science and Medical Bioscience, Waseda Univ., [2]CBBD-OIL, [3]bitBiome, [4]Research organization for Nano and Life Innovation, Waseda Univ., [5]Institute for Advanced Research of Biosystem Dynamics, Waseda Univ.)

難培養性細菌を含む多様な環境細菌解析に向けて、これまでメタゲノム・シングルセルゲノム解析を中心としたさまざまな細菌ゲノム解析手法が開発されてきた。特に、プロファージなどの可動遺伝因子を含め、宿主細菌の形質に大きな影響を与えうるゲノムの構造変異を解析する上で、完全ゲノム配列を獲得することが重要となる。近年、ロングリードシークエンサーを環境細菌解析へ応用することで、メタゲノム情報からの環境細菌の完全ゲノムの獲得が報告されているが、シングルセルゲノム(SAG)情報からの同様の報告はされていない。そこで本研究では、SAG 由来ロングリード情報を用いて細菌完全ゲノムを構築するためのゲノムアセンブリ解析パイプラインを構築した。開発した解析手法は、SAG 獲得のためのゲノム増幅反応時に生じる増幅バイアスを解消しつつ *de novo* アセンブリを行うことで高精度なゲノム配列を構築する。大腸菌 SAG から取得したロングリード情報をモデルとして開発法によるゲノムアセンブリを行った結果、従来法では困難であった、SAG 情報からの完全ゲノム配列の構築が確認された。さらに、実際にヒト腸内細菌のゲノム解析に開発したパイプラインを応用することで、腸内細菌 *Anaerostipes hadrus* について 8 人の検体から 9 株の完全/準完全ゲノム配列が獲得された。*A. hadrus* の完全ゲノム配列の比較によってゲノムの構造変異を解析した結果、各株のゲノム全域にわたって主にプロファージと見られる株特異的配列領域が確認された。本解析手法を、当研究室が保有する微小液滴を用いたハイスループットなシングルセルゲノム増幅技術と組み合わせることで、高精度な細菌ゲノム情報の高速な蓄積およびさらなる詳細な解析への応用が期待される。

In recent years, some complete genomes of environmental bacteria have been acquired using long-read sequencers and metagenomic analysis, but there are no similar reports using single-cell genome analysis. In this study, we constructed a new genome assembly pipeline to construct bacterial complete genomes using SAG (single amplified genome)-derived long-read data. Using long reads obtained from *E. coli* SAGs as model data, we confirmed the construction of the complete genome sequence by our assembly pipeline. Moreover, by applying the pipeline we developed for the human gut bacteria, complete and semi-complete genome sequences of nine strains of *Anaerostipes hadrus* from eight samples. The structural variation analysis of *A. hadrus* genomes identified a wide variety of strain-specific sequence regions throughout the genome of each strain. Our method which enables construct complete genomes from SAGs may contribute to the further expansion of bacterial genome databases.

single-cell genomics, environmental bacteria, complete genome

講演番号：2A03-05
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 10:00～ ミーティングルーム A

Bacillus cereus に感染する広宿主域ジャンボファージ vB¥BceM_WH1 の特性とゲノム解析
Characterization and genome structure of broad host range jumbo phage infecting *Bacillus cereus*

○松中 南[1,2]、上土井 達哉[1]、タイン ヌグイエン コン[1,2]、飯田 拳史[1]、金 相完[1,2]、田代 康介[1,2]、大森 英樹[3]、大島 一能[3]、岩本 武夫[4]、廣政 恭明[1,2]、土居 克実[1,2] ([1]九州大農、[2]日本農芸化学会、[3]大阪工大、[4]慈恵医大)
○Minami MATSUNAKA[1,2], Tatsuya UEDOI[1], Nguyen Cong Thanh[1,2], Takashi IDA[1], Sangwan KIM[1,2], Kosuke TASHIRO[1,2], Hideki OMORI[3], Kazuyoshi OSHIMA[3], Takeo IWAMOTO[4], Yasuaki HIROMASA[1,2], Katsumi DOI[1,2] ([1]Kyushu Univ., [2]JSBBA, [3]OIT, [4]Jikei Univ.)

バクテリオファージのうち、ゲノムサイズが 200 kbp 以上のものは jumbo phage と分類され、高い遺伝的多様性を示す。これら jumbo phage のうち、グラム陽性菌を宿主とするものは報告例が少なく、その特性やゲノム構造解明により、新たな知見が得られることが期待できる。本研究は、*Bacillus* 属を宿主とする新奇な jumbo phage を分離し、その特性とゲノム構造を解析することを目的とした。

vB_BceM_WH1 は、*Bacillus cereus* を指示菌として樹皮より分離された。本ファージはプラーク形状から溶菌ファージと考えられ、電子顕微鏡観察から、直径約 100 nm の正二十面体の頭部、約 300 nm の収縮性尾部を持つことから *Myoviridae* 科に分類された。vB_BceM_WH1 は、*Bacillus thuringiensis*, *Bacillus mycoides* など *B. cereus* の近縁種に感染し、比較的広い宿主域を示した。ゲノム構造解析の結果、vB_BceM_WH1 ゲノムは 229,829 bp で 300 個の ORF が推定された。相同性検索の結果、ORF 中には DNA 複製や核酸代謝関連遺伝子が 29、溶菌関連遺伝子が 4、構造タンパク質遺伝子が 16 同定され、その他は機能未知であった。ファージ粒子タンパク質を SDS-PAGE で分画後、ESI-MS で各断片のアミノ酸配列を決定したところ、21 種のタンパク質が検出された。このような大サイズゲノムは本ファージが進化の過程や宿主との相互作用で獲得したものと考えられた。

Tailed phages with genomes larger than 200 kbp are classified as “jumbo phages.” Phages of this kind usually harbor large virions and are rarely isolated. The jumbo phages infecting Gram-positive bacterial host strains have been rarely isolated, and the host strains of the phages almost belong to the genus *Bacillus*. Therefore, study of the *Bacillus* jumbo phage might provide understanding for new aspects of phage evolution and interaction with the host. Lytic phage vB_BceM_WH1 was isolated from barks with *Bacillus cereus* as an indicator. An electron microscopy revealed that it has an icosahedral-shaped head approximately 100 nm in diameter, a neck, and a contractile sheath 300 nm in length. According to the ICTV classification, vB_BceM_WH1 belongs to the family *Myoviridae*. The phage infected to some species of *B. cereus* group. From nucleotide sequence analysis, genome size of vB_BceM_WH1 was 229,829 bp and 300 ORFs were annotated. Some ORFs similar with nucleic acid metabolic protein-, lytic enzyme- and structural protein- encoding genes of other phages. With ESI-MS analysis, 21 virion proteins were detected. This phage might have evolved from phage with smaller genome by acquiring additional functional genes from its host bacteria.

Bacillus cereus, jumbo phage, gene diversity

発表責任者：土居克実（doi@agr.kyushu-u.ac.jp）

講演番号：2A03-06
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 10:00～ ミーティングルーム A

麹菌 *Aspergillus oryzae* における選択的オートファジーレセプターの探索
Screening of selective autophagy receptors in *Aspergillus oryzae*
○西尾 譲一郎、尾崎 愛奈、島田 侑希、武田 陽一、菊間 隆志（立命館大）
○JOICHIRO NISHIO, AINA OZAKI, YUKI SHIMADA, YOICHI TAKEDA, TAKASHI KIKUMA (Ritsumeikan Univ)

選択的オートファジーは真核生物における特定のオルガネラやタンパク質を液胞に輸送し分解する機構である。麹菌 *Aspergillus oryzae* では、ペルオキシソームやミトコンドリアなどのオルガネラに加え、核をも特異的に分解することが報告されている。一般的に選択的オートファジーの選択性は、隔離膜上に存在する Atg8 と分解基質がもつ特異的なレセプタータンパク質が結合することによって生じると考えられているが、麹菌をはじめとする糸状菌において選択的オートファジーのレセプタータンパク質は発見されていない。本研究は、AoAtg8 結合タンパク質の同定、選択的オートファジーレセプタータンパク質のスクリーニングを目的とした。
【方法・結果】AoAtg8 に TAP (tandem affinity purification)タグを付加した AoAtg8-TAP を発現する株および TAP タグのみを発現する株を炭素源枯渇条件で培養し、TAP 法によって AoAtg8 結合タンパク質を精製した。得られたタンパク質を LC-MS/MS および MASCOT 検索により同定した。その中から、AoAtg8-TAP 発現株および炭素源枯渇時でのみ精製され、機能未知であるタンパク質を 6 個抽出した。それぞれのタンパク質をコードする遺伝子の破壊株を作製したところ、1 つの遺伝子破壊株で菌核形成の促進が観察された。現在、各タンパク質の局在解析を行っており、それぞれタンパク質が細胞内のどの部位に存在するかを検討する予定である。

Selective autophagy is a process in eukaryotic cells for degradation of specific organelles and proteins. In *Aspergillus oryzae*, peroxisomes, mitochondria and nuclei are specifically degraded by selective autophagy. In general, selectivity of the process is caused by the interaction between Atg8 and receptor proteins. However, receptor proteins of selective autophagy would not have been identified in filamentous fungi. In this study, we aim to identify AoAtg8 binding proteins and screen selective autophagy receptors. Using a tandem affinity purification strategy and LC-MS/MS, we identified AoAtg8 binding proteins. Among them, six unidentified proteins which purified from strains expressing AoAtg8-TAP cultured under carbon starvation conditions were screened. We generated disruptants of the six genes and performed phenotypic analysis. Increased sclerotium formation was observed in one of the disruptants. Additionally, we describe the subcellar localization of these proteins.

Aspergillus oryzae, Autophagy, Receptor

講演番号：2A03-07
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 10:00～ ミーティングルーム A

麹菌 *Aspergillus oryzae* のヌクレオファジーにおけるオートファジー関連遺伝子 *Aoatg8* と *Aoatg15* の機能解析

Functional analysis of autophagy-related genes *Aoatg8* and *Aoatg15* in the nucleophagy of *Aspergillus oryzae*

○黄梅 昌朗[1]、藤田 純佳[1]、吉田 稔[1,2,3]、有岡 学[1,2]（[1]東大院農・応生工、[2]東大・微生物連携機構、[3]理研環境資源セ）
○ Masaaki KOBAI[1], Junka FUJITA[1], Minoru YOSHIDA[1,2,3], Manabu ARIOKA[1,2] ([1]Dept. Biotechnol., Univ. Tokyo, [2]CRIIM, UTokyo, [3]RIKEN CSRS)

オートファジーは真核生物で高度に保存された、細胞質成分の液胞/リソソームへの輸送を介した細胞内分解プロセスの総称である。その中で核を分解するものはヌクレオファジーと呼ばれる。細胞内に複数の核を持つ麹菌 *Aspergillus oryzae* では核全体がヌクレオファジーによって分解されるという特徴的な現象が観察されている。本研究ではヌクレオファジーによる核タンパク質分解におけるオートファジー関連タンパク質 AoAtg8（オートファゴソーム膜構成成分）と AoAtg15（オートファジックボディ分解に関与する推定液胞リパーゼ）の機能について検討を行った。野生株、Δ*Aoatg8* 株、Δ*Aoatg15* 株に対し、ヌクレオファジーマーカー候補の核タンパク質としてヒストン H2B、ヒストン H1 の EGFP 融合タンパク質を発現させ、栄養飢餓によるオートファジー誘導を行い、その分解を調べた。その結果、Δ*Aoatg8* 株、Δ*Aoatg15* 株では野生株と比較してヒストン H2B の分解が抑制されたが、ヒストン H1 では分解抑制は観察されず、核タンパク質間で分解のオートファジー機構への依存度に違いがあることが示唆された。Δ*Aoatg15* 株では Δ*Aoatg8* 株と同様にオートファジー欠損株に特徴的な気中菌糸および分生子形成の著しい阻害が観察された。現在、より明瞭なヌクレオファジー観察系構築を目的として、オートファゴソームー液胞融合の段階に働く *YPT7* ホモログ欠損株の作製、他のヌクレオファジーマーカーの探索等を行っている。

Autophagy is the highly conserved intracellular degradation process in which cytoplasmic components are transported to vacuoles/lysosomes and degraded. Selective degradation of the nucleus by autophagy is called nucleophagy, and the degradation of whole nuclei is observed in *Aspergillus oryzae*. In this study, the roles of autophagy-related proteins AoAtg8 (autophagosome membrane component) and AoAtg15 (vacuolar lipase involved in autophagic body degradation) in autophagic degradation of nuclear proteins were examined. As nuclear marker proteins, histone H1-EGFP and histone H2B-EGFP, were expressed in wild type, Δ*Aoatg8*, and Δ*Aoatg15* strains. Upon nutrient starvation, the degradation of histone H2B was suppressed in autophagy-deficient strains, but histone H1 degradation was not affected. Δ*Aoatg15* strain showed severe defects in the formation of aerial hyphae and conidia, which are characteristics of autophagy-deficient strains. To observe the nucleophagy process in detail, we are now constructing a *YPT7* homolog-deficient strain having a defect at the stage of autophagosome-vacuole fusion. A search for other nucleophagy markers is also in progress.

autophagy, nucleus, *ATG* genes

発表責任者：黄梅昌朗（koubai-masaaki465@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2A03-08
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 10:00～ ミーティングルーム A

Identification and characterization of proteins involved in nucleophagy in *Aspergillus oryzae*

○Junfeng Peng[1], Minoru Yoshida[1,2,3], Manabu Arioka[1,2] ([1]Dept. Biotechnol., Univ. Tokyo, [2]CRIIM, UTokyo, [3]RIKEN CSRS)

[Background] Autophagy is a highly conserved and tightly regulated process in eukaryotes in which excessive or abnormal proteins and organelles are transported to vacuoles/lysosomes for degradation to maintain cell growth, development, and homeostasis. Autophagy is executed through *ATG* genes, among which *ATG8* plays a central role since Atg8 family proteins are responsible for binding/recognition of cargo molecules destined for degradation and/or cargo receptors/adaptors via their Atg8-interacting motif (AIM). As one type of autophagy, nucleophagy in *Aspergillus oryzae* is a process of removal of whole nuclei through selective macroautophagy, which might be regulated by a kind of specific receptor/adaptor protein that could bind to AoAtg8 (Atg8 ortholog in *A. oryzae*). However, its molecular identity is yet to be elucidated.

[Methods] Tandem affinity purification (TAP) and LC-MS/MS analysis were performed to search for proteins that bind to N-terminally TAP-tagged AoAtg8. Localization of candidate proteins was analyzed by fluorescence microscopy of EGFP-fused proteins. Degradation of nuclear components was monitored by the processing assay in which the degradation of *Aspergillus nidulans* histone H2B (AnH2B)-EGFP was examined. Yeast two-hybrid (Y2H) assay and co-localization analysis were performed to verify the binding of candidate proteins to AoAtg8.

[Results] By analyzing the LC-MS/MS data, we selected six AoAtg8-interacting candidate proteins to be explored in the subsequent analyses based on the Mascot scores and the presence of AIM sequences. From the localization study, five but one candidate proteins were found to be localized to nucleus. The results of AnH2B-EGFP processing assay in the mutants deleted for the genes encoding these five proteins showed that nucleophagy induced by deprivation of carbon or nitrogen sources was not affected in the four disruptants. However, the degradation of AnH2B-EGFP was compromised in one mutant deleted for a gene named *nprA* (*n*ucleo*p*hagy *r*eceptor), which was recovered in the complemented strain. In the Y2H assay, we found that NprA, but not others, binds to AoAtg8. Furthermore, among the three putative AIM sequences in NprA, AIM3 (WVMV) was found to be functional since the binding of NprA to AoAtg8 in the Y2H assay was abolished in the AIM3 mutant. Co-localization study showed that while mDsRed-AoAtg8 was distributed throughout the cytoplasm under the nutrient-rich condition, it translocated to the crescent-shaped autophagosome-like structure upon carbon starvation, to which NprA was localized. Taken together, we propose that NprA is a potential nucleus-resident receptor/adaptor involved in nucleophagy in *A. oryzae*.

autophagy, nucleus, Atg8-interacting motif (AIM)

発表責任者：Manabu Arioka（arioka@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2A03-09
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 10:00～ ミーティングルーム A

黄麹菌 *Aspergillus oryzae* のエンドサイトーシスにおける AAA ATPase AipA の分子機構解析

Analysis of molecular mechanism of AAA ATPase AipA in endocytosis in *Aspergillus oryzae*

○日浅 怜子、竹川 薫、樋口 裕次郎（九大院生資環）
○Reiko HIASA, Kaoru TAKEGAWA, Yujiro HIGUCHI (Kyushu Univ.)

エンドサイトーシスとは、細胞外からの栄養源の獲得やシグナル伝達等、多くの生命機能と関連する重要な機構であるが、黄麹菌 *Aspergillus oryzae* においては未だ詳細な分子メカニズムが明らかになっていない。黄麹菌のエンドサイトーシス関連因子 AoAbp1 の相互作用タンパク質 AipA は、エンドサイトーシスへの関与が示唆されているものの、詳しい機能については未解明である。そこで本研究では、AipA を中心としたエンドサイトーシスの分子機構の解明を目的とした。

アルギニントランスポーターである AoCan1 に EGFP を融合し、選択的にエンドサイトーシスを誘導できるマーカーを用いて、エンドサイトーシスの経時的解析を行った。その結果、*aipA* 過剰発現株では WT と比べてエンドサイトーシスが遅延したことから、AipA はエンドサイトーシスを負に制御することが示唆された。また、Δ*Aoabp1* 株および Δ*aipA*Δ*Aoabp1* 株ではともにエンドサイトーシスが遅延したことから、AipA は AoAbp1 の下流で機能することが示唆された。

Endocytosis is a crucial cellular mechanism which is involved in acquisition of nutrient sources and signal transduction, widely conserved in eukaryotes. However, detailed molecular organizations are still unknown in *Aspergillus oryzae*. We have identified the AAA ATPase AipA as a protein that interacts with AoAbp1 which is related to endocytosis in *A. oryzae*; however, little is known about the molecular function of AipA. Therefore, in this study, we aimed to clarify the molecular mechanisms associated with AipA in *A. oryzae*.

To investigate localization and endocytosis of AoCan1, an arginine transporter as an endocytosis maker, fusion protein was expressed with an enhanced green fluorescent protein (EGFP) in *A. oryzae* cells. Then, endocytosis was induced by the addition of arginine in the medium. We found that endocytosis of AoCan1-EGFP was facilitated in Δ*aipA* cells. In contrast, in *aipA*-overexpressing cells, the endocytosis of AoCan1-EGFP was delayed compared to WT cells. These results suggest that AipA negatively regulates endocytosis in *A. oryzae.* Moreover, in $aipA^{K542A}$-overexpressing cells, the uptake of AoCan1-EGFP was proceeded at the same rate as WT cells, indicating that the AAA ATPase activity of AipA is important for its function in endocytosis. Furthermore, we found that in both Δ*Aoabp1* and Δ*aipA*Δ*Aoabp1* cells, the endocytosis of AoCan1-EGFP was delayed, suggesting that AipA functions in the downstream of AoAbp1 in endocytosis.

endocytosis, AAA ATPase, *Aspergillus oryzae*

講演番号：2A03-10
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 10:00～ ミーティングルーム A

出芽酵母グリセロール輸送体 Stl1 のグルコース不活性化に必要な α-アレスチン Rod1 による Stl1 認識領域の探索

Role of the C-terminal region of yeast glycerol transporter Stl1 in its glucose-induced and ubiquitination-dependent inactivation by α-arrestin Rod1

○藤田 翔貴、五味 勝也、新谷 尚弘（東北大農）
○SHOKI FUJITA, GOMI KATSUYA, TAKAHIRO SHINTANI (Tohoku Univ.)

細胞の原形質膜上には、多様な栄養源を取り込む輸送体や外界環境に対するセンサータンパク質が存在している。醗酵産業上有用な微生物である出芽酵母は環境中へのグルコースの流入により、エネルギー生産を呼吸からエタノール発酵へとシフトさせる。その制御は、転写レベルのみならず、タンパク質レベルでも行われ、糖新生関連酵素や種々の炭素源輸送体はグルコース刺激によってすみやかに分解、除去される。真核生物における原形質膜輸送体の分解はターゲット輸送体が選択的にユビキチン付加されることで誘発されている。近年、α-アレスチン Rod1 がグルコースシグナル制御下で、モノカルボン酸輸送体 Jen1 やグリセロール輸送体 Stl1 のユビキチン化を制御していることが報告された。現在までに、Jen1 の C 末端領域が分解調節領域として機能しており、グルコース依存的に Rod1 による認識を受け、近傍のリジン残基がユビキチン化されることを明らかにしてきた。そこで、Rod1 依存的な輸送体認識機構の理解を深めることを目的として、Rod1 による Stl1 の認識やそれに伴うユビキチン修飾に着目し解析を行った。まず、Stl1 の N 末端と C 末端領域の部分欠損体を作製し解析を行ったところ、Stl1 の C 末端領域(Stl1 C-tail)の部分欠損体でグルコース依存的な分解が抑制された。さらに、Stl1 のグルコース依存的な分解は、Stl1 C-tail 中に存在しているリジン残基や酸性アミノ酸を含む F_{532}GE 配列への変異導入によって抑制されることが明らかとなった。以上の結果より、Stl1 C-tail は Rod1 による認識部位とユビキチン化部位を内包していることが示唆された。

In the presence of glucose, non-fermentable carbon sources transporters undergo endocytic degradation in *Saccharomyces cerevisiae*. In higher eukaryotes, signal-dependent ubiquitin modification of plasma membrane (PM) transporters triggers its selective endocytosis and sorting to the vacuole/lysosome for degradation. An E3 ubiquitin ligase Rsp5 is responsible for ubiquitination of the transporters and requires α-arrestin adaptor proteins for recognition of target proteins. In previous studies showed an α-arrestin Rod1 involved in glucose-induced internalization of glycerol transporter Stl1and lactate/pyruvate transporter Jen1. Although Rod1 could act as a Rsp5 adaptor during the glucose inactivation of Stl1, it is unclear how Rod1 regulates Stl1 degradation. Here, in deletion analyses of Stl1 C-tail, we identified the regions required for Stl1 inactivation. Moreover, mutational analyses revealed that Stl1 ubiquitination was impaired by mutation of K_{529} or F_{532}GE, resulting in repressed glucose-induced Stl1 internalization. These results suggested that Stl1 the C-terminal motif was important for the glucose and Rod1 dependent endocytosis.

Saccharomyces cerevisiae, transporter, glucose repression

講演番号：2A03-11
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 10:00～ ミーティングルーム A

発酵食品に由来する高ポリアミン産生菌の分離

Isolation of high-polyamine-producing bacteria derived from fermented foods

○白澤 秀斗[1]、平野 里佳[1,2]、栗原 新[1] ([1]近畿大生物理工、[2]石川県大生資環)
○ Hideto SHIRASAWA[1], Rika HIRANO[1,2], Shin KUHIHARA[1] ([1]Kindai Univ., [2]Ishikawa Prefectural Univ.)

ポリアミンの摂取が動物の健康寿命延伸に大きく寄与していることが報告されている。発酵食品にはポリアミンを高濃度で含むものが存在し、そのポリアミンは発酵微生物由来であることが考えられた。これら食経験のある発酵微生物からポリアミンを高生産する細菌をスクリーニングできれば、その培養上清からポリアミン高含有サプリメントを作出できるほか、プロバイオティクスとして摂取した場合に消化管内でのポリアミン産生が期待される。

本研究では、様々な発酵食品から高濃度でポリアミンを産生する菌を分離することを目的として、発酵食品より MRS 平板培地を用いて細菌を分離し、液体培養した分離株の培養上清中に含まれるプトレッシンの濃度をプトレッシンオキシダーゼを用いた簡易定量法で解析した。この結果、*Staphylococcus epidermidis* FB146 の培養上清中に高濃度のプトレッシンが含まれていることが推定され、HPLC 分析によりその培養上清中には、最大で 478 μM のプトレッシンが存在していた。これまでに *Staphylococcus* 属細菌のポリアミン産生能について、体系的に解析を行った研究は存在しない。そこで、代表的な *Staphylococcus* 属細菌 21 菌種の基準株および本研究で新たにスクリーニングした *S. epidermidis* FB 146 について、その培養上清および菌体内のポリアミン産生能を解析した。

It has been reported that the intake of polyamines contributes significantly to the extension of healthy life in animals. Some fermented foods contain high concentrations of polyamines, which were thought to be derived from fermenting microorganisms. Screening of a microorganism that produce high concentration of polyamines from these fermenting microorganisms makes it possible to produce polyamine-rich supplements from the culture supernatants. Additionally the polyamine high-producing microorganisms taken as a probiotic could produce polyamines in human gastrointestinal tract. In this study, we isolated bacteria from fermented foods on MRS plate and analyzed the concentration of putrescine in the culture supernatant of isolates by our developed simple quantitative method using putrescine oxidase. It was estimated that the culture supernatant of *Staphylococcus epidermidis* FB146 contained high concentrations of putrescine, and HPLC analysis revealed that the culture supernatant of FB146 contained 478 μM of putrescine. No previous study has systematically analyzed the polyamine production in *Staphylococcus* sp. Therefore, we analyzed the production of polyamines in the culture supernatant and in the cells of 21 type strains of representative *Staphylococcus* species and *Staphylococcus epidermidis* FB146, which was newly screened in this study.

Staphylococcus, polyamine, fermented foods

発表責任者：栗原新（skurihara@waka.kindai.ac.jp）

講演番号：2A03-13
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 10:00～ ミーティングルーム A

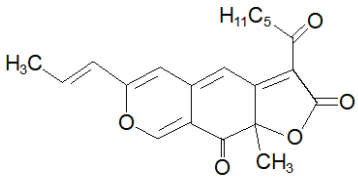
有機溶媒蒸気を用いた *Monascus* 橙黄色色素の選択的生産

Selective production of *Monascus* orange pigments with organic solvent vapor

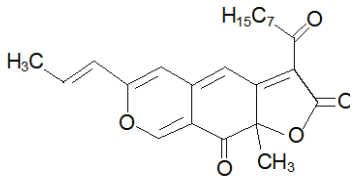
○澁谷 駿太[1]、橘 信二郎[2]、小田 忍[1] ([1]金沢工大ゲノム研、[2]琉球大農)
○ Shunta Shibuya[1], Shinjiro Tachibana[2], Shinobu Oda[1] ([1]Kanazawa Inst. Techol., [2]Univ. Ryukyu.)

Monascus 属糸状菌は、赤色色素の rubropunctamine と monascorubramine、橙黄色色素の rubropunctatin と monascorubrin、黄色色素の monascin と ankaflavin を生産する。これらのうち、特に橙黄色色素は、抗ガンなどの重要な生物活性を有しているが、従来のバイオプロセスではこれらを選択的に生産することは困難であった。本研究では、有機溶媒蒸気と界面バイオプロセスを組み合わせた橙黄色色素の選択的高生産システムの開発を目的とした。

様々な有機溶媒蒸気雰囲気下で *M. purpureus* B-3-1-1 株を平板培養した結果、citronellal 蒸気存在下で赤色色素の生成が有意に抑制された。一方、citronellal の類縁体である citronellol や citronellic acid 蒸気存在下では、赤色色素の生産は抑制されなかった。さらに、1-octanal や 10-undecenal などの脂肪族アルデヒドについても *Monascus* 赤色色素の生合成を抑止する効果が認められた。



Monascorubrin



Rubropunctatin

Some *Monascus* spp. produce red pigments such as rubropunctamine and monascorubramine, orange pigments such as rubropunctatin and monascorubrin and yellow pigments such as monascin and ankaflavin. It is known that the orange and the yellow pigments have some biologically activities such as anti-Alzheimer, anti-obesity, and anti-cancer ones. Thus, the selective production of the pharmaceutically valuable orange and yellow pigments was subjected in this study.

It has been discovered that the production of red pigments by *M. purpureus* B-3-1-1 growing on an agar plate is effectively repressed in the presence of citronellal vapor. However, citronellol and citronellic acid did not inhibit the red pigment production. The repressive effect by organic vapor was also observed in the presence of other two aliphatic aldehydes such as 1-octanal and 10-undecenal. The repressive effect of the aldehydes was also observed in an organic–aqueous interface fermentation system[1,2].

1) Oda, S., *et al.*, Process Biochemistry, **44**, 625–630 (2009).
2) Oda, S., J. Oleo Sci., **66**, 815–831 (2017).

Organic solvent vapor, *Monascus* pigments, Interface bioprocess

発表責任者：澁谷駿太（b1706808@planet.kanazawa-it.ac.jp）

講演番号：2A03-14
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 10:00～ ミーティングルーム A

ヤセウツボの種子発芽阻害物質および生産菌の同定

Identification of the compound that inhibited Orobanche seed germination.

○今田 理彩、永田 真梨、甲斐 建次、炭谷 順一、川口 剛司、谷 修治（阪府大院・生環科）
○Risa IMADA, Mari NAGATA, Kenji KAI, Jun-ichi SUMITANI, Takashi KAWAGUCHI, Shuji TANI (Osaka Pref. Univ.)

【目的】イネ科やマメ科の植物に寄生するハマウツボ科の根寄生植物は、特にアフリカや地中海沿岸の乾燥地域で農作物に甚大な被害をもたらしている。ハマウツボ科ヤセウツボ *Orobanche* の種子は、宿主の根から分泌される strigolactone (SL) を感知して発芽し、宿主に寄生する。本研究は、土壌から単離した微生物由来の二次代謝産物から *Orobanche* の種子発芽を制御する物質を同定することおよび、単離した微生物自体を用いて寄生を防除する方法を確立することを目的としている。【方法および結果】日本各地の土壌から単離した放線菌を培養し、培養液に等量のアセトンを添加して放線菌培養液抽出サンプルを調製した。ムラサキツメクサに寄生する日本自生株 *Orobanche minor* の種子の GR24（合成 SL）に応答した発芽を阻害する物質を放線菌抽出サンプルから探索した。992 サンプルを評価した結果、約半分にあたる 452 サンプルが種子発芽を阻害した。*O. minor* の種子発芽を選択的に阻害する化合物を選抜するため、*Escherichia coli* K12 株、*Aspergillus oryzae* および *Trifolium pratense* (紫詰草) の生育への影響を解析した。*A. oryzae* および *T. pratense* の生育に影響を与えず、*E. coli* の生育阻害率が 60%以下のサンプルのうち、低容量で *O. minor* の種子発芽を阻害したサンプル no. 226 について解析を進めた。no. 226 株の培養液から活性画分を酢酸エチルで抽出し、Wako gel C-200, および Inertsil ODS-3 を用いたカラムクロマトグラフィーにより発芽阻害物質を精製した。精製物質を LC/MS、^{1}H- および ^{13}C-NMR 解析に供した結果、発芽阻害物質を cycloheximide と同定した。現在、*O. minor* の種子発芽の 50%阻害濃度および、微生物自体を用いた寄生防除について検討している段階である。

Striga and *Orobanche* parasitic weeds constitute one of the most important biotic constraints to the production of food crops in Africa and the Mediterranean region. From soil samples, we screened for microbes that produce compounds inhibiting *Orobanche* seed germination in the presence of GR24. Among 992 samples tested, we isolated one sample that inhibit *Orobanche* seed germination but not the growth or germination of *Escherichia coli*, *Aspergillus oryzae*, and *Trifolium pratense*, respectively. Purification of the compound, LC/MS analysis, and ^{1}H-and ^{13}C-NMR analyses revealed that cycloheximide was identified as the inhibitor. We will discuss IC_{50} of cycloheximide on *Orobanche* seed germination and the effect of the isolated microbes on the suppression of the infection of *O. minor* to *T. pratense*.

Orobanchaceae, Biopesticide, *Striga*

発表責任者：谷　修治（shuji@biochem.osakafu-u.ac.jp）

講演番号：2A03-15
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 10:00～ ミーティングルーム A

網羅的代謝解析に基づく新規ハプト藻 *Pavlova* sp.フコキサンチン生産技術の開発

Development of a novel fucoxanthin production technology using Haptophyta *Pavlova* sp. based on the comprehensive metabolic profiling

○吉田 江里菜、加藤 悠一、金本 昭彦、蓮沼 誠久、近藤 昭彦（神戸大）
○Erina Yoshida, Yuichi Kato, Akihiko Kanamoto, Tomohisa Hasunuma, Akihiko Kondo (Kobe Univ.)

微細藻類が生産するフコキサンチンは栄養機能性食品・医薬品原料として幅広い用途がある。微細藻類のフコキサンチン生産に窒素栄養条件が影響を及ぼすメカニズムを代謝レベルで明らかにした報告はない。本研究は微細藻類を用いたフコキサンチン生産技術の開発に向けて、窒素栄養条件の影響を代謝レベルで解析した。ハプト藻 *Pavlova* sp. OPMS30543 を窒素源の異なる培地で培養したところ、NH_4Cl および $NaNO_3$ の培地で細胞増殖が見られた。この際のフコキサンチン含有率はそれぞれ 4.1 mg/g-DCW および 8.4 mg/g-DCW であり、$NaNO_3$ を窒素源とすることで高いフコキサンチン蓄積が達成された（Fig. 1 A)。また $NaNO_3$ の濃度が高い培地ほどフコキサンチン含有率は高レベルに維持された(Fig. 1 B)。$NaNO_3$ を十分量供給することでフコキサンチンの安定的な生産が期待できる。本講演ではさらに、窒素栄養源が細胞内代謝物量に及ぼす影響についても紹介したい。

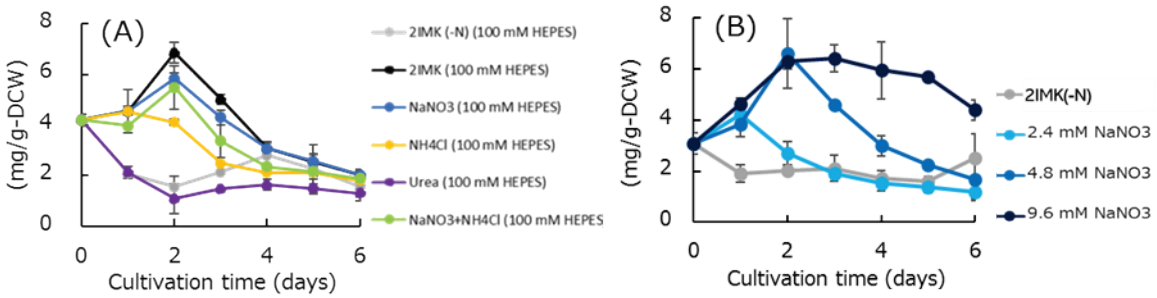


Fig. 1 Fucoxanthin content

Fucoxanthin, a carotenoid synthesized by microalgae, is a high value-add compound. It is available as dietary supplement and pharmaceuticals due to its superior properties such as anti-diabetes. Haptophyta *Pavlova* sp. OPMS30543 highly accumulates fucoxanthin, but mechanism by which nutrients affect the fucoxanthin production has not been revealed. This study investigated influence of nitrogen sources on OPMS30543 fucoxanthin production. OPMS30543 showed higher cell growth and higher fucoxanthin accumulation when supplied with $NaNO_3$ rather than NH_4Cl. In addition, the fucoxanthin content retained at the high level when supplied with high concentration of $NaNO_3$. These results suggest that stable fucoxanthin production can be performed by sufficient $NaNO_3$ supplementation.

fucoxanthin, microalgae, metabolic analysis

発表責任者：吉田江里菜（194p015p@stu.kobe-u.ac.jp）

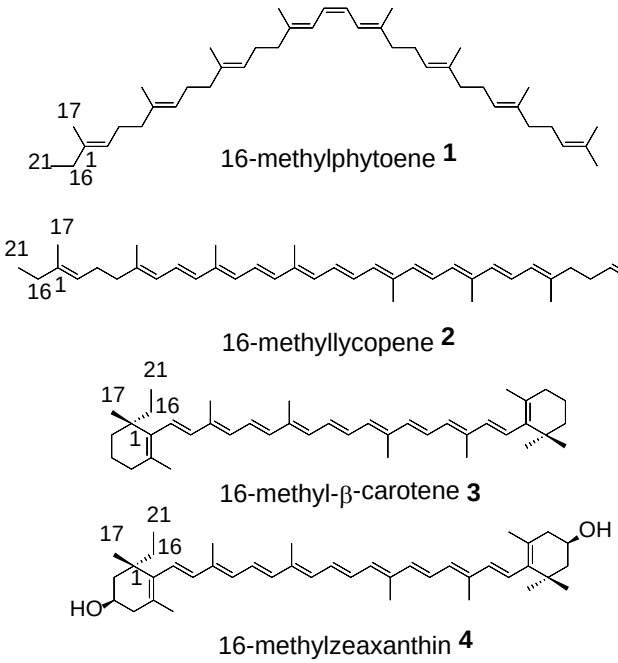
講演番号：2A03-16
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 10:00～ ミーティングルーム A

イソペンテニルピロリン酸メチル化導入酵素遺伝子及びカロテノイド生合成遺伝子を導入した組換え大腸菌を用いた新規 C41 カロテノイドの創製に関する研究

Structures of new C41 carotenoids produced using recombinant Escherichia coli expressing genes encoding isopentenyl pyrophosphate, methyltransferase, and carotenoid biosynthetic enzymes

○高木 千陽[1]、阿部 百花[1]、佐々木 茜[1]、金子 優海[1]、伊藤 歩[1]、酒見 裕香[1]、眞岡 孝至[2]、Breitenbach Jurgen[3]、Sandmann Gerhard[3]、新藤 一敏[1]([1]日女大家政食物、[2]生産開発研究所、[3]Johann Wolfgang Goethe 大学)
○ Chiharu TAKAGI[1], Momoka ABE[1], Akane SASAKI[1], Yumi KANEKO[1], Ayumi ITO[1], Yuka SAKEMI[1], Takashi MAOKA[2], Jurgen Breitenbach[3], Gerhard Sandmann[3], Kazutoshi SHINDO[1] ([1]Japan Woman's Univ., [2]Research Institute for Production Development, [3]Johann Wolfgang Goethe Univ.)

2019 年、Drummond らは *Streptomyces monomycini* の遺伝子クラスターから、生合成基本ユニットである IPP（イソペンテニルピロリン酸）を C6,C7 プレニルピロリン酸にメチル化する IPP C4-methyl transferase（MT）をコードする MT 遺伝子及び 15-*cis*-phytoene, lycopene, β-carotene, zeaxanthin それぞれのカロテノイド生合成遺伝子の 2 種類のプラスミドを導入した組換え大腸菌を作成し、炭素数が増加した $C_{40+\alpha}$ から成るメチル化カロテノイドの創製に成功した。ただし彼らの研究では生産を LC-MS で確認したのみで、どのような構造の $C_{40+\alpha}$ カロテノイドが生産されているかは未確定であった。今回 Drummond らとの共同研究として、本組換え大腸菌の培養、メチル化カロテノイドの単離精製、MS・各種 NMR を用いて構造解析を行うことにより、実際に生合成されたメチル化カロテノイドの化学構造とメチル基の位置を特定した。その結果、メチル化カロテノイドは、C-16 の位置に 1 つのメチル基を持つ C41 カロテノイド 16-methyl phytoene(**1**) , 16-methyl lycopene(**2**) , 16-methyl-β-carotene(**3**) , 16-methyl zeaxanthin(**4**)と同定することができ、これらの化合物は全て新規カロテノイドであった。



In 2019, Drummond *et al*. reported the production of methylated 15-*cis*-phytoene, lycopene, β-carotene, and zeaxanthin using recombinant *Escherichia coli* that express the genes encoding isopentenyl pyrophosphate C4-methyltransferase, and carotenoid (15-*cis*-phytoene, lycopene, β-carotene, and zeaxanthin) biosynthetic enzymes. However, their structures have not determined yet. In this study, we have isolated the methylated carotenoids using chromatographic methods and unambiguously determined their structures as 16-methyl derivatives of 15-*cis*-phytoene, lycopene, β-carotene, and zeaxanthin via detailed MS, 1D, and 2D NMR analyses. These compounds were all identified as novel C41 carotenoids.

C4-methyltransferase, carotenoid biosynthetic enzymes, 16-methylcarotenoids

発表責任者：新藤一敏（kshindo@fc.jwu.ac.jp）

講演番号：2A05-01
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 11:00～ ミーティングルーム A

シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 における DnaA-*oriC* システムの機能化
Functionalization of the DnaA-*oriC* system in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803
○末崎 裕寛[1]、荷村（松根） かおり[1]、大林 龍胆[2]、渡辺 智[1]([1]東京農大院・バイオ、[2]東工大・化生研)
○Yasuhiro Suezaki[1], Kaori Nimura (Matsune)[1], Ryudo Ohbayashi[2], Satoru Watanabe[1] ([1]Tokyo Univ. of Agric, [2]CLS, Tokyo Tech)

バクテリアのほとんどの種において DNA 複製は DnaA が DnaA-box 配列に結合する DnaA-*oriC* システムにより開始するが、酸素発生型光合成細菌であるシアノバクテリアは複製開始機構に多様性が認められる。シアノバクテリア *Synechococcus elongatus* PCC 7942（*S.* 7942）は他の原核生物同様に DnaA-*oriC* により複製を開始するが、*Synechocystis* sp. PCC 6803（*S.* 6803）や *Anabaena* sp. PCC 7120（*A.* 7120）は DnaA が必須ではなく DnaA-*oriC* を利用しないことが示されている (Ohbayashi et al., 2016, ISME J)。*dnaA* 遺伝子はほぼすべてのシアノバクテリアに保存されており、系統解析の結果から *S.* 6803 や *A.* 7120 は進化のなかで依存性を失っていったと考えられる（Ohbayashi et al., 2020, Front Microbiol）。本研究では、*S.* 7942 の DnaA と DnaA-box 配列を *S.* 6803 に移植し、*S.* 6803 が DnaA-*oriC* システムを利用出来るか解析した。免疫沈降法を用いて *S.* 6803 の細胞内において DnaA と特異的に結合する配列を精製し、次世代シーケンスや定量 PCR によりコントロールと比較した。その結果、*S.* 6803 の細胞内において DnaA と DnaA-box との結合が示された。DnaA-box への他の複製因子の結合や複製活性について解析を進めている。

In most bacteria, DNA replication initiates from *oriC*, where DnaA initiator protein binds to DnaA-box sequence and unwind double-strand DNA. We have been observed the diversity of replication initiation in cyanobacteria. Like other prokaryotes, the cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 7942 (*S.* 7942) depends on the DnaA-*oriC* system, whereas *Synechocystis* sp. PCC 6803 (*S.* 6803) and *Anabaena* sp. PCC 7120 does not require DnaA and suggested to utilize other system for replication initiation (Ohbayashi et al., 2016, ISME J). Since DnaA is highly conserved in cyanobacteria, its dependence on DnaA-*oriC* system is thought to be diversified during the evolution of cyanobacteria（Ohbayashi et al., 2020, Front Microbiol）.

In this study, we transferred the DnaA-*oriC* system of *S.* 7942 to *S.* 6803 and tested the function of the DnaA-*oriC* system in *S.* 6803 cells. DnaA binding region in *S.* 6803 were purified using immunoprecipitation and compared with controls by next-generation sequencing and quantitative real-time PCR. Results showed the binding of DnaA to DnaA-box in the *S.* 6803 cells, indicating that *S.* 6803 has the ability to utilize DnaA protein.

DNA replication, Cyanobacteria, DnaA

発表責任者：渡辺 智（s3watana@nodai.ac.jp）

講演番号：2A05-02
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 11:00～ ミーティングルーム A

過酷な環境から単離された微細藻類の光酸化ストレス耐性獲得プログラムのオミクス解析

Omics analysis of the program of photooxidative stress protection in a green microalga isolated from severe growth environments

○豊島 拓樹[1]、佐保 好亮[1]、川口 遼太[1]、オユン スブドエルデネ[1]、江口 知輝[1]、石毛 太一郎[2]、高市 真一[3]、川崎 信治[1,3] ([1]東農大バイオ、[2]東農大ゲノム解析セ、[3]東農大微生物)
○Hiroki TOYOSHIMA[1], Yoshiaki SAHO[1], Ryota KAWAGUCHI[1], Suvd-Erdene OYUN[1], Kazuki EGUCHI[1], Taichiro ISHIGE[2], Shinichi TAKAICHI[3], Shinji KAWASAKI[1,3] ([1]TUA Bio., [2]TUA genome, [3]TUA microbiol.)

【目的】一般の光合成生物は、強光を伴う高塩濃度や乾燥ストレス環境下では、光酸化ストレスが発生し生育が困難になる。当研究チームでは過酷な環境に生息する光合成生物に新規な生命応答の存在を推定し、優れたストレス耐性能を有する微細藻類の単離を行ってきた。単離株の中で真夏のアスファルト表面から単離された真核微細藻類 Ki-4 株は、形態、分子系統学的特徴からイカダモ科に属する新種と判明し、*Coelastrella astaxanthina* と命名した [1)]。本藻類は光酸化ストレス環境下で、藻体を赤色化し長期間生存する高い耐性能を示した。赤色化の原因物質は真核光合成生物では報告例がない水溶性カロテノイド結合タンパク質と判明し、アスタキサンチンを結合することから AstaP と命名した。本タンパク質は細胞表層に局在し、大量に存在することから、光合成生物では報告例のない強光防御機構への関与が推定された。本学会では Ki-4 株の光酸化ストレス耐性獲得過程について解析を行ったので報告する。
【方法・結果】光酸化ストレス(強光+0.7 M NaCl)条件下での、Ki-4 株の生理挙動観察として、光合成解析を行った結果、Ki-4 株はストレス付与直後に低下する光合成活性を速やかに回復し、一週間にわたり光合成活性を維持しながら肥大化し、最終的には休眠細胞を形成する様子が観察された [2)]。ストレス下でのトランスクリプトーム解析の結果、*astaP* 遺伝子は全遺伝子中最も発現が誘導され、Ki-4 株のストレス耐性の主要な因子と推察されたが、他の光酸化ストレス誘導性遺伝子群は機能未知のものが多かった。そこでタンパク質発現と代謝産物変動についてオミクス解析を行い、Ki-4 株が長期ストレス耐性を実現させる代謝について知見の獲得を目指した。

Photooxidative stress leads to generation of Reactive Oxygen Species and results in critical damage in photosynthetic organisms. Recently, we isolated and described a new species microalga, *Coelastrella astaxanthina* Ki-4, from the surface of asphalt in midsummer. Ki-4 can survive for a long period after the cells changed color from green to red under photooxidative stress conditions. We identified a novel water-soluble carotenoid-binding glycoprotein in stressed Ki-4 cells and named it AstaP since it bound astaxanthin. We assumed that Ki-4 has novel photooxidative stress defense mechanisms, not only AstaP expression. In this conference, we report the analysis of the process of acquiring photooxidative stress resistance in Ki-4.

1) Kawasaki et al. *Plant and Cell Physiology* 54:1027-1040 (2013), *Phycological Research* 68:107-114(2020), *Commun. biol*. 3:490 (2020)
2) Toyoshima et al. Algal Research 50 (2020) 101988.

photooxidative stress, orange carotenoid protein, astaxanthin

講演番号：2A05-03
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 11:00～ ミーティングルーム A

過酷な生育環境から単離した微細藻類の新規な光酸化ストレス耐性に関与するタンパク質
Proteome analysis for a novel photooxidative stress tolerance of microalga isolated from severe growth environment.

○佐保 好亮[1]、豊島 拓樹[1]、オユン スブドエルデネ[1]、川口 遼太[1]、江口 和輝[1]、川崎 信治[1,2]([1]東農大バイオ、[2]東農大微生物)
○Yoshiaki Saho[1], Hiroki Toyoshima[1], Suvd-Erdene Oyun[1], Ryota Kawaguchi[1], Kazuki Eguchi[1], Shinji Kawasaki[1,2] ([1]TUA bio., [2]TUA microbiol.)

[目的]一般的な光合成生物は強光、乾燥、高塩濃度などの環境ストレス下では、光酸化ストレスの影響により生育が困難となる。当研究グループは、過酷な環境から単離した微細藻類を用いて環境ストレス耐性機構ついて研究している。単離株の中で真夏のアスファルトより単離した、イカダモ科に属する新種の微細藻類 *Coelastrella astaxanthina* Ki-4(以下 Ki-4 株)は、光酸化ストレス存在下で赤色化を伴い長期間生存した。この赤色化の要因は、真核光合成生物で報告例がない水溶性アスタキサンチン結合タンパク質と判明し、AstaP と命名した [1)]。本タンパク質は光酸化ストレス付与に伴い大量に発現誘導されることから、Ki-4 株における光酸化ストレス防御機構の中核に関与すると考えられる [2)]。一方、光酸化ストレス下でのトランスクリプトーム解析の結果、*astaP* 遺伝子を含む顕著な遺伝子発現変動が観察されたが、多くは機能未知遺伝子であった。そこで本研究では、Ki-4 株のストレス付与前後から長期にかけてのプロテオーム解析を行い、高度の光酸化ストレス耐性に関与するタンパク質群の同定と、その機能解明に着手した。
[方法・結果]ストレス付与直後から長期間（ストレス付与後２週間～４週間）の細胞状態の観察と、細胞のサンプリングを行い、プロテオーム解析を行った。発現が上昇したスポットは AstaP や SOD など抗酸化系酵素や、複数の機能未知タンパク質が同定され、減少したスポットは Rubisco や翻訳伸長因子などの良好な生育時に観察されるタンパク質が同定された。それらは RNAseq のデータとも相関性を示した。増加した機能未知タンパク質の一つは、植物や動物の乾燥耐性に寄与する LEA(late embryogenesis abundant)タンパク質の一種と推定されたが、既知タンパク質とは相同性が低かった。そこで異種宿主での発現系を確立し、その機能同定を試みた。
Coelastrella astaxanthina Ki-4, identified as a novel species, survived for a long time under severe photooxidative stress conditions by producing a novel water-soluble astaxanthin binding protein named AataP. In this study, we performed proteome analysis to know the unidentified mechanisms of photooxidative stress tolerance in this microalga.

1) Kawasaki et al. *Plant and Cell Physiology* 54:1027-1040 (2013), *Phycological Research* 68:107-114(2020), *Commun. biol.* 3:490 (2020)
2) Toyoshima et al. *Algal Research* 50(2020)101988

Photooxidative stress, AstaP, LEA protein

講演番号：2A05-04
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 11:00～ ミーティングルーム A

走化性発現に関わる細菌由来ペクチン結合タンパク質のドメインダイナミクス

Domain dynamics of bacterial pectin-binding protein involved in chemotaxis expression

○穴水 康太郎[1]、髙瀬 隆一[1]、日尾 守[2]、渡辺 大輔[1]、三上 文三[3]、橋本 渉[1]（[1]京大院農、[2]京大農、[3]京大生存研）
○ KOTARO ANAMIZU[1], RYUICHI TAKASE[1], MAMORU HIO[2], DAISUKE WATANABE[1], BUNZO MIKAMI[3], WATARU HASHIMOTO[1] ([1]Graduate School of Agriculture, Kyoto University, [2]Faculty of Agriculture, Kyoto University, [3]Research Institute for Sustainable Humanosphere, Kyoto University)

【目的】グラム陰性 *Sphingomonas* 属細菌 A1 株は、多糖ペクチンに対して正の走化性を示す。その際、SPH1118 がペクチン走化性発現に関わるトリガータンパク質として、ペクチンと結合する[1)]。これは細菌が多糖に対して走化性を示す初めての例である。X 線結晶構造解析により決定した構造的特徴として、SPH1118 は N 末端ドメインと C 末端ドメインから構成されており、両ドメイン間に大きなクレフトが存在する。本研究では、SPH1118 のペクチン認識機構を解明することを目指した。

【結果・考察】SPring-8 で収集した X 線回折データを用いて、基質存在下で結晶化した SPH1118 の立体構造を決定した。これらの構造には、基質は結合していなかった。一方、以前に決定した立体構造（closed 型）と比較するとドメインが 21.8°開いていた（open 型、図 1）。closed 型の SPH1118 のクレフトには、ペクチンオリゴ糖と構造的に類似した緩衝液成分（MES）が 2 分子結合しており、MES が基質アナログとして結合したと考えられる。SPH1118 は基質との結合により closed 型へと構造変化が起こり、ペクチン走化性シグナルを伝達することが示唆された。

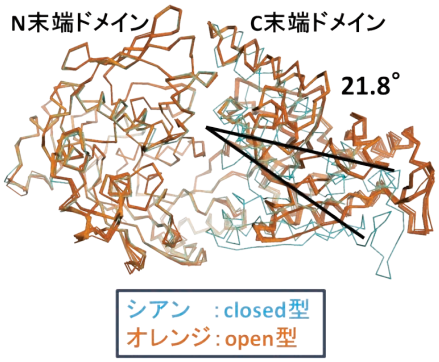


図1. closed型とopen型の構造比較

【Purpose】*Sphingomonas* sp. strain A1 shows a positive chemotaxis toward pectin, which is the first example of bacterial chemotaxis toward polysaccharides. Previously, we have found that strain A1 SPH1118 binds to pectin as a trigger protein for pectin chemotaxis expression [1)]. SPH1118 consists of N- and C-terminal domains with a large cleft between both domains. In this study, we aimed to elucidate its pectin recognition mechanism.

【Results and Discussion】X-ray crystallography was conducted to solve the structure of SPH1118 crystallized in the presence of pectin-derived oligosaccharides; however, no substrates were found in these structures. On the other hand, the domain of these structures (open form, figure 1) was opened at angles 21.8° compared with that of previously determined structure (closd form). Since two molecules of the buffer component (MES) were bound to the cleft in the closed form, MES was regarded as substrate analog. Indeed, the structure of MES was similar to that of pectin oligosaccharides. These results suggest that SPH1118 undergoes the conformational change through binding to the substrate and transmits pectin chemotactic signal.

[1)] Konishi *et al.*, *Sci. Rep.*, **10,** 3977 (2020).

chemotaxis, X-ray crystallography, pectin-binding protein

発表責任者：橋本渉（hashimoto.wataru.8c@kyoto-u.ac.jp）

講演番号：2A05-05
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 11:00～ ミーティングルーム A

希少放線菌 *Actinoplanes missouriensis* の胞子嚢において休眠と覚醒を制御するシグマ-アンチシグマ因子制御系の機能解析

Functional characterization of a sigma-anti-sigma factor system that regulates sporangiospore dormancy and awakening in *Actinoplanes missouriensis*

○手塚 武揚[1,2]、光山 京太[1]、大西 康夫[1,2] ([1]東大院・農生科・応生工、[2]東大・微生物連携機構)
○Takeaki TEZUKA[1,2], Kyota MITSUYAMA[1], Yasuo OHNISHI[1,2] ([1]Gra. Sch. of Agri. and Life Sci., Univ. of Tokyo, [2]CRIIM, Univ. of Tokyo)

【背景】希少放線菌 *Actinoplanes missouriensis* は菌糸生長で増殖する一方、増殖に適さない環境では多数の胞子を内包する胞子嚢を形成して休眠状態に移行する。胞子嚢は水分を感知すると休眠状態から覚醒し、開裂して胞子を放出する。胞子はべん毛により水中を運動し、増殖に適した環境に至ると発芽する。我々は休眠細胞が外部環境の変化を感知して覚醒する分子機構の解明を目的とし、胞子嚢開裂を制御する因子の同定と機能解析を進めている。これまでに、シグマ因子 SsdA とアンチシグマ因子 SipA からなるシグマ因子–アンチシグマ因子システムが胞子嚢開裂を制御しており、SsdA は胞子嚢開裂を抑制する遺伝子群の転写を活性化する一方、SipA が SsdA の機能を抑制することで胞子嚢開裂が起こることが判明している。本発表では SipA–SsdA 間の相互作用様式、および SsdA の機能に関してさらに研究を進めた。【結果】SipA はアンチ–アンチシグマ因子として働く STAS ドメインとアンチシグマ因子として働く RsbW-like ドメインを持つ一方、SsdA はシグマ因子ドメインと STAS ドメインを持つ。大腸菌を宿主とする Two-hybrid assay で両者の相互作用を解析した結果、SipA の RsbW-like ドメインが SsdA の STAS ドメインに結合し、SipA の STAS ドメインがこの結合を阻害したことから、休眠胞子嚢では SipA の STAS–RsbW-like ドメイン間の結合が SsdA との相互作用を阻害し、開裂時には SipA の RsbW-like ドメインが SsdA の STAS ドメインに結合する制御モデルが示唆された。また、ストレス条件での *ssdA* 破壊株の表現型を野生株と比較したところ、0.3% (v/v) 過酸化水素を含む溶液中では *ssdA* 破壊株の胞子嚢開裂が抑制された。このことから、SsdA は酸化ストレス耐性を担う遺伝子の発現を活性化することで、胞子の生存率向上に寄与していると考えられた。

The rare actinomycete *Actinoplanes missouriensis* forms dormant sporangia containing a few hundred spores. In response to water, sporangia open up and release the spores. The sigma factor SsdA activates the transcription of genes for spore dormancy and stress responses, whereas the anti-sigma factor SipA interacts with SsdA to repress its activity during sporangium dehiscence. In this study, we showed that SipA binds to SsdA through the interaction between the C-terminal RsbW-like domain of SipA and the C-terminal STAS domain of SsdA by the bacterial two-hybrid assay. The N-terminal STAS domain of SipA inhibits the interaction probably by binding to the C-terminal RsbW-like domain of SipA. Furthermore, we demonstrated that sporangium dehiscence of the *ssdA* null mutant is severely inhibited in the presence of 0.3% (v/v) H_2O_2, indicating that SsdA is essential for the oxidative stress response in sporangia.

rare actinomycete, sporangiospore, dormancy and awakening

講演番号：2A05-06
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 11:00～ ミーティングルーム A

生育期に伴って変化するペプチドグリカン層が TiO_2 光触媒殺菌効果に及ぼす影響の解析

Analyses of the effect of the peptidoglycan layer changing with the growth phase on the TiO_2 photocatalytic bactericidal effect

○槐 あかね[1]、藤嶋 昭[2]、鈴木 智順[1,2] ([1]東理大応生、[2]東理大総研)
○ Akane SAIKACHI[1], Akira FUJISHIMA[2], Tomonori SUZUKI[1,2] ([1]Department of Applied Biological Science, Tokyo University of Science, [2]Research Institute for Science & Technology, Tokyo University of Science)

近年の環境問題の解決手段として光触媒が注目されているが、その殺菌メカニズムの全容は未解明である。当研究室の先行研究により、細胞壁構造の１つであるペプチドグリカン層が光触媒殺菌を促進することが示された。本研究では、細菌が生育するに従ってペプチドグリカン層の厚さが変化することに着目し、各生育期の細胞外殻構造が光触媒殺菌効果に及ぼす影響の解析を目的とした。

本研究では、光触媒コーティングガラスを用いて、各生育期まで培養した *Lactobacillus plantarum* に対して光触媒反応を行い、生存率を算出した。また、透過型電子顕微鏡を用いた *L. plantarum* 細胞の観察や、ペプチドグリカン添加時のヒドロキシラジカル量の測定を行った。その結果、*L. plantarum* は生育期が進むにつれて、光触媒反応で死滅しやすかった。また、*L. plantarum* 細胞を TEM 観察したところ、定常前期の細胞のペプチドグリカン層は対数前期の約 3 倍厚いことが明らかになった。ペプチドグリカン標品を添加した光触媒反応では、無添加時と比べてヒドロキシラジカル量が減少した。以上の結果より、ペプチドグリカンは量に比例して光触媒殺菌効果を促進するが、光触媒反応で生成するヒドロキシラジカルを消費し、別の抗生物質を生産していることが示唆された。

Photocatalysts have been attracting attention as a means of solving environmental problems, but the entire mechanism of sterilization has not been elucidated. Therefore, we focused on the change in the thickness of the peptidoglycan layer with the growth phase, and analyzed the effect of the cell wall structure in each growth phase on the photocatalytic bactericidal effect.

In this study, the photocatalytic reaction with photocatalytic coated glasses was performed on *Lactobacillus plantarum* at each growth phase. Also, TEM observation of *L. plantarum* and measurement of the amount of hydroxyl radical when peptidoglycan was added were performed. As results, *L. plantarum* was more likely to die as the growth phase progressed. In addition, TEM observation of *L. plantarum* revealed that the peptidoglycan layer in the early stationary phase was about three times as thick as that in the early log phase. The addition of peptidoglycan to the photocatalytic reaction, reduced the amount of hydroxyl radical. From the above, it was suggested that peptidoglycan promotes the photocatalytic bactericidal effect in proportion to its amount and consumes generated hydroxyl radical to produce another bactericide.

photocatalytic bactericidal effect, peptidoglycan, growth phase

講演番号：2A05-07
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 11:00～ ミーティングルーム A

グラム陰性細菌のペプチドグリカン層が光触媒殺菌効果に与える影響の解析

Effect of the peptidoglycan layer of Gram-negative bacteria on the photocatalytic bactericidal effect

○菅佐原 ことね[1]、藤嶋 昭[1,2]、鈴木 智順[1,2]（[1]東理大応生、[2]東理大総研）
○Kotone SUGASAWARA[1], akira FUJISHIMA[1,2], tomonori SUZUKI[1,2] ([1]Department of Applied Biological Science, Tokyo University of Science, [2]Research Institute for Science & Technology, Tokyo University of Science)

TiO_2 を用いた光触媒殺菌効果は、活性酸素種の強い酸化力によるとされているが、その殺菌メカニズムの詳細については未だ明確な知見が得られていない。当研究室の先行研究により、グラム陽性細菌のペプチドグリカン層が光触媒反応の殺菌効果を高めている可能性が示唆された。そこで本研究では、グラム陰性細菌である *Escherichia coli* IAM12119^T（未処理細胞）と、未処理細胞からペプチドグリカン層を取り除いたスフェロプラスト細胞を用いて、ペプチドグリカン層の有無によって光触媒反応による殺菌効果が異なるのかを検証した。
光触媒反応後の未処理細胞とスフェロプラスト細胞の生存率を比較した結果、光触媒反応 3 時間で未処理細胞の方がスフェロプラスト細胞よりも生存率が有意に低い結果となった。このことから、グラム陰性細菌においてもペプチドグリカン層が光触媒反応による殺菌効果を高めている可能性が示唆された。上記の要因を明らかにするために、ペプチドグリカンを構成している各成分をスフェロプラスト細胞に添加して光触媒殺菌する実験、およびペプチドグリカンが光触媒反応で生成する ROS に与える影響の解析などを行い、それらの結果も併せて発表する予定である。

The details of the photocatalytic bactericidal mechanism have not yet been clarified. A previous study in our laboratory suggested that the peptidoglycan layer of Gram-positive bacteria enhances the bactericidal effect of the photocatalytic reaction. In this study, we used *Escherichia coli* IAM12119^T (intact cells), which is a gram-negative bacterium, and spheroplast cells from which the peptidoglycan layer was removed from intact cells, and examined whether the photocatalytic bactericidal effect differs with or without the peptidoglycan layer.

After the photocatalytic reaction, the survival rates of the intact cells were significantly lower than those of the spheroplast cells at 3 hours after irradiation. This result was suggested that the peptidoglycan layer enhances the bactericidal effect by the photocatalytic reaction even in Gram-negative bacteria. To clarify the above factors, we will experiment that each component constituting peptidoglycan is added to spheroplast cells on the photocatalytic sterilization and analyze the effect of peptidoglycan on ROS generated by the photocatalytic reaction. And these results will also be reported.

E. coli, TiO2, peptidoglycan

講演番号：2A05-08
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 11:00～ ミーティングルーム A

放線菌 *Streptomyces vietnamensis* における bald 変異株の特性解析

Genetic and physiological characterization of the bald mutant of *Streptomyces vietnamensis*

○小林 匠[1,2]、森本 諒[1,2]、丸山 友子[1,2]、濱渦 亮子[1]、保坂 毅[1,2] ([1]信州大・バイオメディカル研、[2]信州大院・総合理工)

○ Takumi KOBAYASHI[1,2], Ryo MORIMOTO[1,2], Tomoko MARUYAMA[1,2], Ryoko HAMAUZU[1], Takeshi HOSAKA[1,2] ([1]IBS-ICCER, Shinshu Univ., [2]Grad. Sch. of Sci. and Technol. Shinshu Univ.)

Streptomyces 属放線菌において、気菌糸形成能を欠損した変異株は bald“禿げた”変異株と呼ばれ、その多くは *bld* 遺伝子に変異を有することが知られている。本研究で我々は、*Streptomyces vietnamensis* NBRC 104153 の bald 変異株（SVBD-1）について諸性質を調べたところ、以下に示す興味深い知見を得た。

遺伝学的性質　SVBD-1 の全ゲノム配列を解析し野生株との配列を比較した。その結果、この bald 変異株は、シグマ因子遺伝子における 1 塩基置換と非コード領域における 1 塩基欠失を有しているが、*bld* 遺伝子には変異を持たないことが判明した。

生理学的性質　SVBD-1 を SFM、HV、および LB 寒天培地を用いて 30℃ で培養したところ、気菌糸形成能が回復したコロニーが出現した。一方、興味深いことに、野生株と SVBD-1 を同じ寒天培地上で共培養した検討において、SVBD-1 が野生株の気菌糸形成を促進させることを見出した。

以上の結果は SVBD-1 が既知種とは異なる新しいタイプの bald 変異株であることを示唆した。

Majority of streptomycete strains lacking the ability to form aerial mycelium, which are known as “bald” mutants, harbor a mutation in the *bld* gene. In this study, we investigated the genetic and physiological characteristics of the bald mutant (strain SVBD-1) of *Streptomyces vietnamensis* NBRC 104153 and obtained the following interesting findings:

Genetic characteristics. Comparative whole genomic analysis between strain SVBD-1 and its wild-type strain showed that strain SVBD-1 harbored a single nucleotide substitution and deletion in the gene encoding a sigma factor and a noncoding region, respectively; however, it did not harbor any mutations in the *bld* gene.

Physiological characteristics. When strain SVBD-1 was grown at 30°C on HV, LB, and SFM agar media, colonies that could restore their ability to form aerial mycelium emerged. On the other hand, strain SVBD-1 stimulated the formation of aerial mycelium in the wild-type strain following their co-cultured. Our findings suggest that strain SVBD-1 might be a new type of bald mutant different from known species harboring mutations in the *bld* gene.

Streptomycetes, *Streptomyces vietnamensis*, bald mutants

発表責任者：保坂毅（thosaka@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：2A05-09
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 11:00～ ミーティングルーム A

有明海から単離した乳酸菌を含む培養液が農作物バイオマス量の増大にもたらす効果の野外検証について

The increase effect of the crop biomass by the medium containing lactic acid bacteria obtained from Ariake Sea.

○木原 久美子[1]、安藤 千治[2]（[1]熊本高専、[2]株式会社安藤通商）
○Kumiko KIHARA[1], Chiharu ANDO[2] ([1]NIT, Kumamoto college, [2]ANDOTSUSHO CO., Ltd.)

近年の農業では、化成肥料による土壌の改善や農作物の成長制御だけでなく、微生物による土壌状態の保持や農作物の成長や品質への効果も有効であることが示されており、両者を複合的に用いることによって健全な農作物を育てる取り組みが世界的になされている。微生物の中でも乳酸菌は、農業において様々な形で有益な効果をもたらすことが経験的に知られている。その一方で、それらの経験を裏付ける科学的なデータが、経験的な知見者が思っているほど多くはないという現実も存在する。そこで本研究では、この乳酸菌に着目し、実際の農業の現場において乳酸菌の存在が農作物のバイオマス量にもたらす効果を検証した。乳酸菌は自然界の至るところに生息しているが、本研究では九州の有明海から乳酸菌を採取し単離した。単離した乳酸菌株を酵母や米ぬかとともに大量培養し、これを希釈して複数の農作物の土壌に添加した。農作物を一定の期間栽培し、収穫時の農作物バイオマス量を測定した。これにより、乳酸菌株を含む培養液が、農作物の成長に影響を与えるかどうかについて検証した。本研究では、農作物の中でも主に、日本人の主食として重要な米の栽培において、乳酸菌培養液がもたらす効果について検証した結果を議論する。乳酸菌の存在が農作物のバイオマス量を増大させる可能性があることが示唆されている。

In recent years, chemical fertilizers have been used to improve soil and control the growth of crops. In addition, microorganisms are improving the soil and maintaining the quality of crops. Efforts are being made around the world to grow healthy crops by using both chemical fertilizers and microorganisms in combination. It is known microorganisms benefits to agriculture in various forms, above all, lactic acid bacteria are one of the most commonly used microorganisms. Though it is empirically known that lactic acid bacteria have a positive effect on crops, there is not as much scientific data to support these experiences as empirical experts think. Therefore, we focused on the lactic acid bacterium and investigated its effect to the crop biomass. Lactic acid bacteria are widespread in nature and, in this study, it was collected and isolated from the Ariake Sea in Kyushu. The isolated lactic acid bacterium strain was mass-cultured together with yeast and rice bran, then we added it to the field to examine whether the culture medium containing the lactic acid bacterium strain affects the growth of crops. We are going to mainly discuss here the results of verifying the effects of lactic acid bacteria culture in the cultivation of rice, which is important as a staple food for Asian people. It has been suggested that the presence of lactic acid bacteria may increase the biomass material of crops.

crop biomass, lactic acid bacterium, Ariake Sea

発表責任者：木原久美子（kihara@kumamoto-nct.ac.jp）

講演番号：2A05-10
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 11:00～ ミーティングルーム A

スクミリンゴガイとボウフラに食毒性を示す微生物由来タンパク質毒素

Microbial protein that is toxic to apple snails and mosquito larvae

○武部 聡[1]、吉相 真也[1]、東 慶直[1]、早川 徹[2] ([1]近大生物理工、[2]岡山大院ヘルスシステム統合科学)
○ So TAKEBE[1], Shinya KISSO[1], Yoshinao AZUMA[1], Tohru HAYAKAWA[2] ([1]Kindai Univ., [2]Okayama Univ.)

Cry46Abは土壌細菌*Bacillus thuringiensis*（Bt）が産生するタンパク質で、ボウフラ、淡水生巻貝などに食毒性を示す。蚊はデング熱やジカ熱などの感染症を媒介する。スクミリンゴガイは東アジアや東南アジアではイネの害虫である。Cry46Abはこれら有害生物を駆除する生物農薬の開発に役立つと考えられる。
Cry46Abはアエロリシンタイプのβ型膜孔形成毒素（β-PFT）である。β-PFTは標的細胞表面にある受容体と結合した後、毒素の構造変化を伴うオリゴマー化によりβバレルを形成し、それを細胞膜に陥入して生じる小孔により細胞膜の透過性を撹乱し、細胞を死に至らしめると考えられている。β-PFTに属する毒素の立体構造はよく似ており、受容体結合から膜孔形成にいたる各ステップを担う局所的構造、モチーフやパターンなど、についても提唱されている。Cry46Abは複数の生物種に致死活性を示す毒素である。そこで、標的細胞認識領域があるドメインⅠのアミノ酸置換変異体を作製し、それらの致死活性と標的細胞膜結合性について検討した。

Cry46Ab is a protein produced by the soil bacterium *Bacillus thuringiensis* (Bt) and is toxic to mosquito larvae and snails. Mosquitoes carry infectious diseases such as Dengue fever and Zika fever. Apple snails are rice pests in East and Southeast Asia. Cry46Ab is thought to be useful in the development of biopesticides that control these pests.
Cry46Ab is an aerolysin-type β-type poreforming toxin (β-PFT). The action of β-PFT is multi-step. First, β-PFT binds to receptors on the surface of target cells. Next, a β-barrel is formed by oligomerization accompanied by a structural change of the toxin, and a prepore structure is obtained. Finally, it is thought that the β-barrel is invaginated into the cell membrane to form small pores, which disturbs the permeability of the cell membrane and causes the cell to die. The three-dimensional structures of toxins belonging to β-PFT are very similar, and local structures, motifs and patterns that are responsible for each step from receptor binding to pore forming toxin have also been proposed. Cry46Ab is a toxin that is lethal to multiple species. We prepared amino acid substitution mutants of domain I with a target cell recognition region, and examined their lethal activity and target cell membrane binding.

insecticidal protein, pore-forming toxin, *Bacillus thuringiensis*

発表責任者：武部　聡（takebe@waka.kindai.ac.jp）

講演番号：2A05-11
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 11:00～ ミーティングルーム A

大腸菌 K-12 株におけるピルビン酸応答転写因子 PdhR によるゲノム転写制御ネットワークの解明
Expanded roles of pyruvate-sensing PdhR in transcription regulation of *Escherichia coli* K-12 genome

○安西 拓実[1]、今村 壮輔[2]、石浜 明[3]、島田 友裕[1] ([1]明治大・農、[2]東工大・化生研、[3]法政大・マイクロナノテク研)
○Takumi ANZAI[1], Sousuke IMAMURA[2], Akira ISHIHAMA[3], Tomohiro SHIMADA[1] ([1]Agri. of Sch., Meiji Univ., [2]CLS, Tokyo Inst. Tech., [3]Micro-Nano Tech. Res. Ctr., Hosei Univ.)

大腸菌におけるピルビン酸応答転写因子 PdhR は、ピルビン酸異化経路のマスターレギュレーターであり、ピルビン酸脱水素酵素複合体や電子伝達系遺伝子群を転写抑制することが知られている。そのため､代謝における PdhR の影響については多くの知見が報告されているが､ゲノムに対する PdhR の転写制御の全貌は明らかになっていない。そこで本研究では、PdhR によるゲノム転写制御ネットワークの解明に着手した。はじめに Genomic SELEX(gSELEX)法を用いて、PdhR の支配下遺伝子群の網羅的な同定を試みた。その結果、既知の支配下遺伝子群を含む、35 か所の PdhR 結合領域を同定した。これらの新規 PdhR 制御下遺伝子群に対する PdhR の影響を、ゲルシフトアッセイ、RT-qPCR、ノーザンブロット解析により解析した。その結果、PdhR が脂肪酸分解遺伝子群やピルビン酸に直接作用する複数の代謝経路を制御していることが示唆された。さらに、GC 解析の結果、*pdhR* 欠損株において遊離脂肪酸の増加が確認された。また、運動性遺伝子群に対しては負の制御に働くことが示唆された。以上のことから、PdhR は細胞内ピルビン酸濃度を感知し、ピルビン酸の濃度に直接的に影響を与える複数の炭素源代謝経路、および、細胞の運動性を制御するグローバルレギュレーターであることが示唆された(Anzai *et al, Microbial Genomics*, 2020)。本年会では、大腸菌 K-12 株におけるピルビン酸応答転写因子 PdhR の新たな役割について議論したい。

Transcription factor PdhR has been recognized as the master regulator of the pyruvate catabolism pathway in *Escherichia coli*. In order to identify the whole set of regulatory targets under the control of pyruvate-sensing PdhR, we performed Genomic SELEX (gSELEX) screening *in vitro*. A total of 35 PdhR-binding sites were identified along the *E. coli* K-12 genome. Possible involvement of PdhR in regulation of the newly identified target genes was analyzed in details by gel shift assay, RT-qPCR and Northern blot analysis. Results indicate the participation of PdhR in positive regulation for fatty acid degradation genes and negative regulation for cell mobility genes. In fact, GC analysis indicated the increase of free fatty acids in the mutant lacking *pdhR*. Taken together, we propose that PdhR is a bifunctional global regulator, including not only the genes involved in central carbon metabolism but also some genes for the surrounding pyruvate-sensing cellular pathways and cell motility. At this annual meeting, we would like to discuss the novel roles of pyruvate-sensing PdhR in transcription regulation of *Escherichia coli* K-12.

Escherichia coli, pyruvate regulator, transcription regulation

発表責任者：島田友裕（tomoshimada@meiji.ac.jp）

講演番号：2A05-12
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 11:00～ ミーティングルーム A

DNA 構造パラメーターを用いた麹菌由来転写因子 AoXlnR 制御メカニズムの網羅的解析

Comprehensive analysis of transcription factor AoXlnR in Aspergillus oryzae by using DNA confomational parameters

○岡 大椰[1]、兒島 孝明[1]、井原 邦夫[2]、小林 哲夫[1]、中野 秀雄[1] ([1]名古屋大学大学院生命農学研究科、[2]名古屋大学遺伝子実験施設)
○Hiroya Oka[1], Takaaki Kojima[1], Kunio Ihara[2], Teshuo Kobayashi[1], Hideo Nakano[1] ([1]Grad of Bioagricultural Sciences, Nagoya Univ., [2]Center for Gene Research, Nagoya Univ.)

我々は、Genomic SELEX-Seq (gSELEX-Seq)と発現変動解析によって得られる情報を統合することで、転写因子によって直接的に発現制御される遺伝子をゲノムワイドで同定する手法を確立している。このシステムを *Aspergillus oryzae* におけるキシラン、セルロースやペントース代謝などに関与する転写因子 AoXlnR の標的遺伝子の同定に適用したところ、プロモーター領域に DNA 結合モチーフを保有するものの、その転写因子の過剰発現に応答しない遺伝子が多数検出された。このことから、転写因子-DNA 間相互作用には、DNA 配列に加え、未知の要因が関与していることが示唆された。

そこで本研究では、配列間の相互作用を数値で表現可能な DNA の 3 次元構造情報に着目し、gSELEX-Seq や DNA マイクロアレイ解析から得られた AoXlnR 制御遺伝子情報をもとに、結合モチーフ付近の DNA 構造と下流に位置する遺伝子の発現変動との関連性評価モデルを機械学習により構築した。この構築されたモデルを用いた詳細な解析により、特定のポジションにおける DNA 構造情報が AoXlnR における転写因子制御に寄与していることが明らかとなった。この一連の転写制御解析は、転写因子による制御メカニズムの高精度かつ網羅的な理解に大きな力を発揮すると考えられる。

By integrating information obtained from genomic SELEX-Seq (gSELEX-Seq) and gene expression analysis, we have established an analysis system for genome-wide identification of genes that are regulated directly by a transcription factors (TFs). When this system was applied to the identification of target genes of an *Aspergillus oryzae* TF, AoXlnR, which regulate xylan, cellulose, and pentose metabolism, thousands of genes that with one or more DNA-binding motifs in the upstream region of the start codon but showed no response to over-expression of the TF were detected. This suggests that unknown factors are involved in the TF-DNA interaction in addition to DNA binding motif.

In this study, we focused on 3D DNA shape information, which differs from one sequence to another, and construct a model to evaluate the relationship between the DNA structure near the binding motif and the differential expressions of genes using machine learning based on the AoXlnR-regulated gene information obtained from gSELEX-Seq and DNA microarray analysis. Detailed analysis using the constructed model revealed that DNA structural information at specific positions contributes to the transcriptional regulation by AoXlnR. This series of transcriptional regulatory analyses could contribute considerably to a more accurate and comprehensive understanding of the mechanisms of regulation by TFs.

Transcription factors, Aspergillus oryzae, bioinfomatics

発表責任者：岡大椰（oka.hiroya@molbiotech-nagoya.org）

講演番号：2A05-13
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 11:00～ ミーティングルーム A

Serratia plymuthica における小分子 RNA によるキチン分解酵素系の制御
Regulation of chitin-degrading enzyme system by small RNA in *Serratia plymuthica*
○小嶋 優常[1]、堀井 恭子[1]、宗像 直輝[1]、熊木 智耶[2]、石田 知輝[2]、杉本 華幸[1,2]、鈴木 一史[1,2] ([1]新潟大院・自然科学、[2]新潟大・農)
○ Yujo KOJIMA[1], Kyoko HORII[1], Munakata NAOKI[1], Tomoya KUMAKI[2], Tomoki ISHIDA[2], Hayuki SUGIMOTO[1,2], Kazushi SUZUKI[1,2] ([1]Grad. Sch. of Sci. and Tech., Niigata Univ., [2]Fac. of Agric., Niigata Univ.)

Serratia marcescens 2170 は、不溶性の β-1,4-GlcNAc ポリマー・キチンを効率的に分解し利用するため、3 種のキチナーゼとキチン結合タンパク質 CBP21 からなるキチン分解酵素を産生している。先行研究において、$(GlcNAc)_2$ の取り込みによりキトポリン遺伝子である *chiP* の転写が活性化されると、小分子 RNA ChiX が *chiP* mRNA の 5′ UTR と塩基対を形成し、キチン分解酵素遺伝子の転写因子をコードする *chiR* mRNA の 5′ UTR との塩基対が解除されると考えられた。*chiP* の転写が ChiX による *chiR* の発現抑制を解除し、キチン分解酵素群の発現に影響を与え、この現象には RNA シャペロンタンパク質である Hfq が関与していると考えられた。*hfq* を破壊した *S. marcescens* 2170 は極端に生育が悪く、このまま実験を継続することは不可能と考えられた。そこで、同じ *Serratia* 属細菌であり、同様のキチン分解酵素が保存されている *S. plymuthica* を用いて実験を行った。Datsenko & Wanner による大腸菌の遺伝子破壊法を用いて *S. plymuthica* の染色体上の遺伝子の破壊を試みた。その結果、*chiX*, *hfq* 等の遺伝子の破壊に成功した。*chiX* 破壊株はキチン分解酵素を生産したが、*hfq* 破壊株は生産しなかった。

Serratia marcescens 2170 produces chitin-degrading enzymes consisting of three types of chitinase and the chitin-binding protein, CBP21, to degrade and utilize the insoluble β-1,4-GlcNAc polymer, chitin, efficiently. In previous studies, when the transcription of *chiP* encoding a chitopolin gene was activated by the uptake of $(GlcNAc)_2$, the small RNA ChiX base paired with the 5' UTR of *chiP* mRNA encoding a transcription factor of the chitin degrading enzyme genes. And then, the base pair of 5' UTR of *chiR* mRNA with ChiX was broken. Transcription of *chiP* released the suppression of *chiR* expression by ChiX and affected the expression of chitin-degrading enzymes. It was suggested that the RNA chaperone protein Hfq is involved in this phenomenon. The *hfq* disrupted mutant of *S. marcescens* 2170 grew exceptionally poorly. Therefore, further experiments were conducted using *S. plymuthica*, which belongs to the same genus and in which the same chitin-degrading enzyme is conserved. The gene on the chromosome of *S. plymuthica* was disrupted by the method used in *Escherichia coli* by Datsenko & Wanner. As a result, we succeeded in disrupting genes such as *chiX* and *hfq* in *S. plymuthica*. The *chiX*-disrupted strain produced chitin-degrading enzymes, but the *hfq*-disrupted strain did not.

Serratia plymuthica, Hfq, small RNA

発表責任者：鈴木 一史（ksuzuki@agr.niigata-u.ac.jp）

講演番号：2A05-14
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 11:00～ ミーティングルーム A

好気性窒素固定細菌 Azotobacter vinelandii におけるニトロゲナーゼを酸素から保護する機構の解明に向けたトランスクリプトーム解析

Transcriptome analysis of aerobic nitrogen-fixing bacterium Azotobacter vinelandii to elucidate mechanisms to protect nitrogenase from oxygen

○滝本 廉[1]、立道 祐輝[2]、黒田 浩一[1]、植田 充美[1] ([1]京大院農、[2]キッコーマン株式会社)
○Ren TAKIMOTO[1], Yuki TATEMICHI[2], Kouichi KURODA[1], Mitsuyoshi UEDA[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Kikkoman Corp.)

【背景】

ニトロゲナーゼは、自然界で唯一窒素分子をアンモニアに還元することの出来る酵素であるが、酸素分子に触れると不可逆的に失活してしまうことが知られている。この酸素感受性がボトルネックとなり、現在のところニトロゲナーゼの効率的な利用は達成されていない。そこで、生存に酸素を必要とする一方で酸素に弱いニトロゲナーゼを用いて窒素固定を行う好気性窒素固定細菌 *Azotobacter vinelandii* に着目した。我々はこの細菌におけるニトロゲナーゼを酸素から保護する機構をトランスクリプトーム解析によって解明しようと試みている。

【方法と結果】

ニトロゲナーゼを酸素から保護する遺伝子は、窒素固定条件下において酸素濃度依存的な発現変動を示すと考えられる。そこで、培養時の気層の酸素濃度を変化させた窒素源含有・非含有培地で菌体を培養したのちにトランスクリプトーム解析を行った。その結果、窒素固定条件においてのみ酸素濃度依存的に発現量が増大する遺伝子を複数個同定することができた。我々はこれらの遺伝子の内、機能が未知のものについて破壊実験を行い、ニトロゲナーゼの酸素からの保護に関わる新規遺伝子を発見したので報告する[1]。

Nitrogenase is the only enzyme capable of reducing molecular nitrogen to ammonia, but is known to be irreversibly inactivated by exposure to O_2 immediately. This oxygen sensitivity has hindered us from taking advantage of nitrogenase. To overcome this situation, we focused on *Azotobacter vinelandii*, the aerobic nitrogen-fixing bacterium. The genes to protect nitrogenase from O_2 are thought to show O_2 concentration-dependent expression changes under the nitrogen-fixing condition. We performed transcriptome analysis after culturing the bacteria in medium with or without a nitrogen source under several O_2 concentrations. As a result, we could identify some genes of unknown functions whose expression increased depending on O_2 concentrations only under the nitrogen-fixing condition. We generated knock out strains of such genes and found a novel gene involved in the protection of nitrogenase from O_2.

[1] Takimoto *et al.* submitted.

Nitrogenase, Transcriptome, Azotobacter vinelandii

発表責任者：滝本廉（takimoto.ren.73r@st.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：2A05-15
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 11:00～ ミーティングルーム A

出芽酵母におけるクロマチン構造の人工制御システムの開発

Development of artificial controlling system of chromatin structure in *Saccharomyces cerevisiae*

○山本 凌大、天井 貴光、植田 充美、黒田 浩一（京大院農）
○Ryota YAMAMOTO, Takamitsu AMAI, Mitsuyoshi UEDA, Kouichi KURODA (Kyoto Univ.)

【背景】

真核生物はヒストンと DNA の複合体であるクロマチンを持つ。クロマチンは、ユークロマチンとヘテロクロマチンという 2 種類の構造を持ち、その構造変換によって転写や DNA の複製等、生命の重要な機能に関与するタンパク質との相互作用が変化する。そのため、クロマチン構造を人工的に変換させることで、細胞分化などの生命現象を制御することもできると考えられるが、クロマチン構造を人工的に制御する技術はまだ確立できていない。そこで、私たちは出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を用いて、「クロマチン構造の人工制御システム」の開発に挑んでいる。

【方法と結果】

クロマチン構造を制御する機構の一つであるヒストン修飾に着目し、出芽酵母 *S. cerevisiae* のゲノムの目的領域のヒストン修飾を試みた。ヌクレアーゼ活性を欠損させた dead Cas9 にヒストン修飾酵素を融合し、目的領域を認識する guide RNA とともに恒常的に発現させることで、目的領域でのクロマチン構造変換を促した。その結果、クロマチンの構造がヘテロクロマチンからユークロマチンに変換したと考えられる酵母株を取得できた。この酵母株について、FAIRE-qPCR を用いて、クロマチン構造を調べたところ、実際にクロマチン構造が変換していることが確認できた[1]。

Eukaryotes have chromatin, which is a complex of histones and DNA. Chromatin has two types of structures, euchromatin and heterochromatin. Chromatin structure affects the interactions of proteins involved in essential functions of life, such as transcription. Therefore, artificial control of chromatin structure would allow for regulating life phenomena. However, the technology for artificial alteration of the chromatin structure has not been established. In this study, we are trying to establish “chromatin structure-regulating system” in *Saccharomyces cerevisiae*. We focused on histone modification, one of the mechanisms for controlling the chromatin structure, and attempted to promote histone modification in a target region of genomic DNA. We introduced the guide RNA and the fusion protein of a dead Cas9 and a histone modifying enzyme into *S. cerevisiae* to change the chromatin structure of the target region. As a result, we obtained the yeast strain whose chromatin structure seemed to be changed from heterochromatin to euchromatin. FAIRE-qPCR analysis suggested that the chromatin structure was actually changed by this system [1].

[1] Yamamoto *et al*. submitted.

Chromatin structure, Histone modification, *Saccharomyces cerevisiae*

発表責任者：山本 凌大（yamamoto.ryota.25c@st.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：2A06-01
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 13:00～ ミーティングルーム A

黄麹菌 *Aspergillus oryzae* における AoCdc48 の生理機能解析

Physiological analysis of AoCdc48 in *Aspergillus oryzae*

○守田 湧貴、竹川 薫、樋口 裕次郎（九大院・生資環）
○Yuki Morita, Kaoru Takegawa, Yujiro Higuchi (Dept. of Biosci. Biotechnol., Kyushu Univ.)

Cdc48 は、プロテアソーム分解機構に必須な因子であり、ストレス応答やシグナル伝達、細胞分化などの様々な生命現象において重要な役割を担っている。しかし、糸状菌類において未だその分子生理機能は明らかとされていない。本研究では、有用性が高い黄麹菌 *Aspergillus oryzae* を用いて糸状菌における Cdc48 の機能性を明らかにすることを目的として研究を行った。

黄麹菌における Cdc48 である AoCdc48 を過剰発現させ、生育への影響を観察した。その結果、コロニー形態に異常が見られ、分生子数および気中菌糸長の有意な低下が確認された。このことから、黄麹菌における生育において、AoCdc48 は細胞内で適切な発現レベルを維持する必要があることが示唆された。次に、プロテアソーム分解経路の一つである小胞体関連分解の機能性を確認したところ、*Aocdc48* の著しい発現変動による小胞体関連分解の機能低下が確認された。また、出芽酵母と同様に *Aocdc48* の発現抑制によってプロテアソームの局在異常を引き起こすことも確認された。これらの結果から、AoCdc48 が出芽酵母などと同様の機能を保存していることが明らかとなった。さらに、*Aocdc48* 発現抑制時における細胞小器官の局在解析を行い、核やゴルジ体といった様々な細胞小器官の局在が異常になることを明らかにした。これらの結果から、AoCdc48 は細胞小器官の局在化に関与し、細胞極性の維持に重要な役割を有することが示唆された。

Cdc48 is an essential factor in the ubiquitin proteasome system (UPS) and plays an important role in various biological phenomena. However, its functionality in filamentous fungi is unknown. In this study, we studied to clarify the functionality of AoCdc48, the sole Cdc48 ortholog in *Aspergillus oryzae*.

First, we investigated growth phenotypes by the overexpression of *Aocdc48*, and found aberrant colonial morphology in *Aocdc48* overexpression. In addition, we confirmed that the number of conidia and aerial hyphal length were significantly reduced. Next, we investigated functionality of endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD). As a result, we found that the ERAD functionality was deteriorated by overexpression and repression of *Aocdc48*. Furthermore, we analyzed localization of proteasomes, and found that they exhibited aberrant localization. These results are consistent with the information of Cdc48 in *Saccharomyces cerevisiae*, and thus we determined that AoCdc48 has similar function to Cdc48. Next, we discovered that AoCdc48 is important for cell polarity in *A. oryzae*. When *Aocdc48* was repressed, the localization of nucleus and Golgi apparatus exhibited aberrant and the formation of the apical vesicle cluster Spitzenkörper was inhibited.

Aspergillus oryzae, Cdc48, ubiquitin proteasome system

発表責任者：守田湧貴（moritayuuki.795@gmail.com）

講演番号：2A06-02
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 13:00～ ミーティングルーム A

分裂酵母に特有な新規 VPS 遺伝子の機能解析

Identification and characterization of a novel VPS gene in fission yeast.

○稲川 智章、大久保 和真、樋口 裕次郎、竹川 薫（九州大農）
○Tomoaki INAGAWA, Kazuma OKUBO, Yujiro HIGUCHI, Kaoru TAKEGAWA (Kyushu Univ.)

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* において、液胞へのタンパク質輸送や液胞形態形成には、*VPS*(vacuolar protein sorting)と呼ばれる多数の遺伝子群が関与している。一方、分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* においても *VPS* 遺伝子と相同性の高い遺伝子を有しており、これまで当研究室において解析されてきたが、まだ未解明な部分も多く存在している。その過程において、機能未知遺伝子 SPBC1709.03 を破壊すると液胞局在 CPY が細胞外にミスソートする VPS 表現型を示すことを見出した。

興味深いことに、この遺伝子と相同性の高い遺伝子は分裂酵母 4 種や一部の子嚢菌類には存在するが、出芽酵母には存在しない。このことから、本遺伝子産物が関与する特有な液胞タンパク質輸送機構が分裂酵母には存在することが示唆された。そこで本研究ではこの遺伝子の機能解析を試みた。

SPBC1709.03 欠損株では液胞局在タンパク質の輸送欠損の他に、FM4-64 が正常に液胞膜へと輸送されないエンドサイトーシス欠損の表現型を示した。さらに解析の結果、本タンパク中の DUF3844 という機能未知ドメインが液胞タンパク質輸送に重要であることを明らかにした。

In the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*, genetic selections and genome-wide screens have resulted in the identification of a large number of genes (called *VPS* genes) required for delivery of proteins to the vacuole. We found that most of the genes required for vacuolar biogenesis and protein transport are conserved between *Schizosaccharomyces pombe* and *S. cerevisiae*. Although the roles of the fission yeast *vps* genes were revealed, the transport mechanism to the vacuole still remains elusive. In this study, we found that the deletion of *S. pombe* gene SPBC1709.03 showed the missort of vacuolar CPY to the cell surface. The SPBC1709.03 encodes a protein (428 aa) with two transmembrane regions. This protein has DUF3844 family domain, and homologs in other fission yeasts and some ascomycetes, but does not have homologs in *S. cerevisiae*. This suggests that fission yeast has a unique vacuolar protein transport mechanism which this gene product is involved. The deletion of SPBC1709.03 gene resulted in pleiotropic phenotypes including low-temperature sensitivity and endocytosis defects. These results suggest that SPBC1709.03 protein is essential for the sorting of vacuolar proteins and for the internalization process in *S. pombe*.

Schizosaccharomyces pombe, vacuolar protein sorting, endocytosis

講演番号：2A06-03
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 13:00～ ミーティングルーム A

酵母小胞体におけるタンパク質フォールディングを改善する因子のスクリーニング方法の開発

Screening of factors improving protein folding in yeast ER.

○瀧井 佳歩[1]、寶関 淳[2]、阪井 康能[1] ([1]京大院農、[2]京都先端大バイオ環境)
○Kaho TAKII[1], Jun HOSEKI[2], Yasuyoshi SAKAI[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Kyoto Univ. Advanced Science)

メタノール資化性酵母はタンパク質の分泌生産に基礎・応用研究ともに利用されている。小胞体は分泌及び膜タンパク質合成と成熟の場であり、小胞体におけるフォールディング効率は分泌タンパク質の生産量を決める主要な因子である。また、小胞体に構造異常タンパク質が蓄積した状態は小胞体ストレスと呼ばれ、この状態が継続するとアポトーシスを引き起こし、ヒトにおける様々な疾患発症の原因になる。そのため、小胞体におけるフォールディング能の向上は疾患治療や予防につながるものと考えられる。

本研究では、メタノール資化性酵母 *Komagataella phaffii* の小胞体におけるタンパク質のフォールディング能を向上させる新規因子を探索するスクリーニング系構築について報告する。スクリーニング基質としては、GFP の改変体である ERroGFP iL (iL) を用いた。iL はフォールディング能が低いため、蛍光強度が低い。興味深いことに iL は小胞体への局在率が悪く、サイトゾルへの拡散が観察された。一方、iL に 4 つの安定化変異を導入することで当研究室にて開発した、小胞体レドックスプローブ ERroGFP S4 (S4) は小胞体に安定発現・局在し、十分な蛍光強度を有する。S4 を positive control として iL の蛍光強度を小胞体におけるフォールディング能の指標とし、シグナル配列や発現プロモーターを検討し、フローサイトメトリー において iL 発現株と S4 発現株における蛍光強度の差を検出できる実験系を確立した。現在、本スクリーニング系を用いて iL 発現酵母株に *Komagataella phaffii* ゲノムライブラリーを導入し、iL 単独発現株に比べて蛍光強度が有意に上昇した株を FACS によるハイスループット解析により新規因子の探索を実施している。

Methylotrophic yeast is useful for secretory protein production. Protein folding efficiency in the ER is one of the important factors for the protein productivity. In this study, we have developed the screening system to identify factors improving protein folding in the ER of the methylotrophic yeast *Komagataella phaffi*. An ER resident fluorescent protein, ERroGFP-iL (iL) was used for monitoring folding ability of the ER. iL shows weak fluorescence due to its low folding efficiency in the ER. We optimized the signal sequence and the expression promoter of iL for the screening using fluorescence intensity of iL as an index of folding ability in the ER, and then have established the screening system on flowcytometry. We have now introduced genome library into the cells expressing iL and sorted cells that show higher fluorescence by FACS.

ER, folding, screening

講演番号：2A06-04
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 13:00～ ミーティングルーム A

Saccharomyces eubayanus における細胞内小器官の動態
Organelle dynamics in *Saccharomyces eubayanus*
○高橋 朋子[1,2]、加藤 拓[2]、只見 秀代[2]、永富 康司[2]、岩間 亮[1,3]、堀内 裕之[1,3]、野田 陽一[1,3]（[1]東大・院農生科・応生工、[2]アサヒクオリティーアンドイノベーションズ（株）醸造科学研究所、[3]東大・微生物連携機構）
○Tomoko TAKAHASHI[1,2], Taku KATO[2], Hideyo TADAMI[2], Yasushi NAGATOMI[2], Ryo IWAMA[1,3], Hiroyuki HORIUCHI[1,3], Yoichi NODA[1,3] ([1]Dept. of Biotech., UTokyo, [2]Brewing Science Laboratories, Asahi Quality & Innovations, Ltd., [3]CRIIM, Dept. of Biotech., UTokyo)

ビール醸造に使用されている下面発酵酵母 *Saccharomyces pastorianus* は、*Saccharomyces cerevisiae* と *Saccharomyces eubayanus* の交雑から生まれたとされる異質倍数性酵母である。異質倍数性生物では異なる種の染色体から重複した機能を有するタンパク質が発現し、細胞内に混在するため、特異的な遺伝子発現制御やタンパク質複合体の形成、機能発現が行われていることが予想される。*S. pastorianus* におけるこうした機構を解明することを目的とし、まずは未解明な部分の多い *S. eubayanus* の細胞内小器官について研究を行っている。

本発表では、*S. eubayanus* のミトコンドリアや液胞、小胞体、ゴルジ体等の細胞内小器官について、試薬染色や局在タンパク質による観察を行い、様々な培養条件下での細胞内小器官の動態の *S. cerevisiae* との差異を検証した内容を報告する。

The bottom-fermenting yeast *Saccharomyces pastorianus*, used in beer brewing, is a hybrid of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces eubayanus*. In allopolyploid, proteins with duplicated functions are expressed from the chromosomes of different species and mixed in the cells, which may lead to specific regulation of gene expression, formation of protein complexes, and expression of functions. In our investigation of these mechanisms in *S. pastorianus*, we are studying organelles of *S. eubayanus*, which are yet to be understood.

In this presentation, we will report on the differences in the dynamics of organelles such as mitochondria, vacuoles, endoplasmic reticulum, and Golgi apparatus between *S. cerevisiae* and *S. eubayanus* under various culture conditions, using reagent stains and localized proteins.

Saccharomyces eubayanus, organelles, morphology

講演番号：2A06-05
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 13:00～ ミーティングルーム A

分裂酵母におけるホスホリパーゼの機能解析
Role of phospholipases in fission yeast
○中村 大地、奥津 果優、吉﨑 由美子、髙峯 和則、二神 泰基、玉置 尚徳 (鹿児島大農)
○DAICHI NAKAMURA, KAYU OKUTSU, YUMIKO YOSHIZAKI, KAZUMONI TAKAMINE, TAIKI FUTAGAMI, HISANORI TAMAKI (Kagoshima Univ.)

細胞膜を構成するグリセロリン脂質は *sn*-2 位に不飽和結合を有し膜の柔軟性を生み出している。しかし不飽和結合は酸化により切断されるとホスホリパーゼ(PL)による損傷アシル基の切断とアシル基転移酵素による新たなアシル基導入により修復される。PL にはグリセロリン脂質の *sn*-2 位を切断するホスホリパーゼ A2(PLA2)、の他に *sn*-1 位を切断するホスホリパーゼ A1(PLA1)、その両方を基質とするホスホリパーゼ B(PLB)に分類されるが、それぞれの酵素の役割は明らかになっていない。本研究では、分裂酵母における PLA1、PLA2、PLB の機能解析を目的とした。はじめに、分裂酵母ゲノムデータベースを検索し、推定 PLA1 遺伝子を 2 つ(SPCC1020.13c、SPAC20G8.02)、PLA2 遺伝子を 1 つ(*plg7*)、PLB 遺伝子を 5 つ(*plb1*、SPAC1A6.03c、SPCC1450.09c、SPAC977.09c、SPAC1786.02)を見出した。まず、分裂酵母におけるこれらホスホリパーゼの細胞内局在性を調べることを目的として、GFP との融合タンパク質発現ベクターを構築し分裂酵母に形質転換を行った。その結果、Plg7-GFP や SPAC1786.02-GFP において細胞分裂時に隔壁や小胞体膜への局在、胞子形成時における PLA1-GFP、PLA2-GFP、PLB-GFP の前胞子膜への局在を観察した。次に、各々のホスホリパーゼ遺伝子を欠損させたことによる表現型の探索を目的として破壊株を構築した。取得した破壊株を用いて栄養培地における生育比較を行った結果、野生株と破壊株で顕著な差は見られなかったが、過酸化水素添加による酸化ストレス下において PLA1、PLA2、PLB 遺伝子の単独破壊株で感受性が認められた。また、PLA1、PLA2 遺伝子の 3 重破壊株(ΔSPCC1020.13cΔSPAC20G8.02Δ*plg7*)株では、酸化ストレスに対して野生株や PLA1、PLA2 遺伝子の単独破壊株よりも顕著な感受性を示した。

Phospholipase is a lipolytic enzyme that hydrolyzes acyl residue of glycerophospholipids. Although PLA1, PLA2 and PLB are classified according to differences in cleavage sites of glycerophospholipids, respectively, their biological functions are poorly understood. In this study, we tried to examine the role of PLA1, PLA2 and PLB in fission yeast. We found two PLA1 genes, one PLA2 gene and five PLB genes in the *S.pombe* genome database. To investigate subcellular localization of these enzymes we observed each GFP fusion proteins under a fluorescence microscope. We also obtained each phospholipase gene deletion mutants and examined these phenotypes. Some mutants exhibited growth defect in YES containing H_2O_2.

fission yeast, phospholipase, oxidative stress

発表責任者：玉置尚徳（noritama@chem.agri.kagoshima-u.ac.jp）

講演番号：2A06-06
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 13:00～ ミーティングルーム A

糸状菌 *Aspergillus terreus* におけるエルゴチオネインの生合成に関する研究
Study on biosynthesis of ergothioneine in *Aspergillus terreus*

○林 大三[1]、福井 志帆[2]、浜田 勇和[1]、村田 紋奈[1]、柿崎 徹也[1]、鈴木 孝征[1,3]、金政 真[1,2]（[1]中部大院・応生、[2]中部大・環生科、[3]中部大・応生化）
○Daizo HAYASHI[1], Shiho HUKUI[2], Hayato HAMADA[1], Ayana MURATA[1], Tetsuya KAKIZAKI[1], Takamasa SUZUKI[1,3], Shin KANAMASA[1,2] ([1]Grad. Sch. Biosci. Biotech., Chubu Univ., [2]Dept. Envi. Biol., Chubu Univ., [3]Dept. Biol. Chem. Chubu Univ.)

エルゴチオネイン(ERG)はライ麦角菌から単離された含硫アミノ酸の一種であり強い抗酸化活性を有する。ヒドロキシルラジカルの捕捉作用による活性酸素種の除去やエラスターゼ活性阻害・チロシナーゼ活性阻害によるシミ・シワの抑制など様々な生理活性があり、機能性生体物質として注目されている。微生物では真菌や細菌において ERG の生産が報告されているが、多様性に富む真菌のうち一部でしか発見されておらず、生産誘導条件など生合成制御に関する研究は進んでいない。これまでに我々は、イタコン酸やロバスタチンの生産菌として知られる糸状菌 *Aspergillus terreus* の網羅的代謝解析により本菌が ERG を合成していると考えられる結果を得た。本研究では、本菌の細胞に含まれる ERG を高精度に解析し、前駆体添加や環境ストレス付与が ERG 生合性に与える影響を調べた。

まず本菌を pH6.0 にて 3 日間前培養し、ストレスとして塩化ナトリウムの添加や低・高 pH で 4 日間本培養した。また、メチオニンを前駆体として培地に添加して 4 日間本培養した。菌体を回収し、乳鉢で破砕し、Bligh-Dyer 法にて精製して調製した試料を HPLC-UV にて分析した。その結果、本菌にて初めて高精度に ERG を検出した。また、塩ストレスの条件では塩濃度の上昇につれて ERG は減少したが、pH ストレスの条件では pH3、pH2、pH8 の順で ERG が増加した。メチオニンを前駆体として添加した実験では ERG がメチオニン添加量に応じて増加した。本講演では麹菌 *Aspergillus oryzae* を用いた行った同様の実験と、*A. terreus* の RNA-seq 解析の結果についても報告する。

Ergothioneine (ERG) is a type of sulfur-containing amino acid and is a functional biological substance having various physiological activities. Productions of ERG has been confirmed only in some kinds of fungi and bacteria, and research on induction conditions has not progressed. In this study, ERG from *Aspergillus terreus* was analyzed with high accuracy, and the effects of precursor addition and environmental stress on ERG biosynthesis were investigated. As a result, ERG was detected for the first time in *A. terreus*. Amount of ERG decreased under salt stress conditions, and increased in the order of pH 3, pH 2, and pH 8. Amount of ERG increased as the amount of methionine added increased. We will also report the result of an experiment using *Aspergillus oryzae* as ERG producer, and of RNA-seq analysis of *A. terreus*.

ergothioneine, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus oryzae*

発表責任者：金政　真（kanamasa@isc.chubu.ac.jp）

講演番号：2A06-07
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 13:00～ ミーティングルーム A

プロテアソーム阻害剤の Ashbya gossypii のリボフラビン生産に与える影響
The Effect of the Proteasome Inhibitor Ashbya gossypii on Riboflavin Production
○横森 愛美[1]、鈴木 里歩[2]、畔上 純也[1]、朴 龍洙[3]、加藤 竜也[3] ([1]静大・総科技院、[2]静大農、[3]静大グリーン研)
○Ami YOKOMORI[1], Riho SUZUKI[2], Jyunya AZEGAMI[1], Enoch Y. PARK[3], Tatsuya KATO[3] ([1]Dept. Agric. Grad. Sch. Integr. Sci. Tech., Shizuoka Univ., [2]Shizuoka Univ., [3]Res. Inst. Green Sci. Tech., Shizuoka Univ.)

Ashbya gossypii は、リボフラビンを生産する子嚢菌である。以前の研究でヒートショックタンパク質（HSP）遺伝子である *AgHSP104* 遺伝子がリボフラビン生産と関係がないことを報告した。本研究では、HSP と同様にタンパク質の恒常性に関係するプロテアソームを阻害する MG-132 を用いて、プロテアソームとリボフラビン生産との関係性を調べた。YD 培地（1%グルコース、1%酵母エキス、pH6.8）に 25 μM MG-132 の添加することで、菌体当たりのリボフラビン生産量が約 72%低下した。また、MG-132 添加によりユビキチン化されたタンパク質の蓄積が認められ、ミトコンドリア膜電位の上昇がわずかに認められた。ミトコンドリアに存在する NADH 酸化還元酵素活性は約 48%増加したが、コハク酸脱水素酵素活性は約 48%減少していた。コハク酸脱水素酵素阻害剤であるマロン酸を 20 mM 培地に加えたところ、菌体当たりのリボフラビン生産量が約 22%減少した。これらの結果から、*A. gossypii* におけるリボフラビン生産には、プロテアソームとミトコンドリアの機能が関係していることが示唆された。

Ashbya gossypii is a filamentous Ascomycete that produces riboflavin. We reported in a previous study that the heat shock protein (HSP) gene, *AgHSP104* gene, is not related to riboflavin production. In the present study, we examined the relationship between the proteasome and riboflavin production using MG-132 which inhibits the proteasome. The addition of 25 μM MG-132 to YD medium (1% glucose, 1% yeast extract, pH 6.8) reduced the riboflavin production by approximately 72%. The accumulation of ubiquitinated proteins and a slight increase in mitochondrial membrane potential with the addition of MG-132 were observed. NADH oxidoreductase activity in mitochondria increased by approximately 48%, whereas succinate dehydrogenase activity was reduced by approximately 48%. The addition of malonate, which is known as a succinate dehydrogenase inhibitor, at 20 mM medium reduced the riboflavin production by approximately 22%. These results suggest that the proteasome and mitochondrial functions may be involved in the riboflavin production in *A. gossypii*.

Ashbya gossypii, Riboflavin, Proteasome

発表責任者：加藤竜也（kato.tatsuya@shizuoka.ac.jp）

講演番号：2A06-08
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 13:00～ ミーティングルーム A

微細藻類ユーグレナのワックスエステル発酵制御に関わる WSRK 下流因子の解析

Analysis of a down-stream target factor of WSRK, a regulatory kinase of wax ester fermentation in Euglena gracilis Z

○駒井 陽輔[1]、石井 侑樹[1]、小川 貴央[1]、丸田 隆典[1]、重岡 成[2]、石川 孝博[1] ([1]島根大院・自然科学、[2]近畿大・附属農場)
○Yosuke KOMAI[1], Yuuki ISHII[1], Takahisa OGAWA[1], Takanori MARUTA[1], Shigeru SHIGEOKA[2], Takahiro ISHIKAWA[1] ([1]Grad. Sch. Nat. Sci. Technol., Shimane Univ., [2]Exp. Farm, Kindai Univ.)

微細藻類ユーグレナは、嫌気条件下においてワックスエステル発酵と呼ばれる独自の代謝経路により、ミリスチルミリスチン酸 (C28) を主成分とするワックスエステルを合成する。我々はこれまでに、ワックスエステル発酵制御には WSRK (Wax ester Synthesis Regulation Kinase) と命名した新奇プロテインキナーゼが関与することを明らかにしている。今回、WSRK によるワックスエステル発酵制御機構を明らかにするため、その下流標的因子の同定を試みた。嫌気処理前後のユーグレナ細胞を用いたリン酸化プロテオーム解析の結果より、ワックスエステル代謝関連酵素のうち、ピルビン酸からアセチル CoA の変換に関わるピルビン酸デヒドロゲナーゼ(PDH)複合体のαサブユニットおよびピルビン酸:$NADP^+$オキシドレダクターゼ(PNO)のリン酸化レベルが、嫌気条件に応答して変動していた。PDHαサブユニットおよび PNO の各抗リン酸化ペプチド抗体を作製し、嫌気処理前後の *WSRK* 遺伝子サイレンシングユーグレナ細胞に対してイムノブロット解析を行った。その結果、PDHαサブユニットのリン酸化レベルは影響を受けなかったのに対し、PNO のリン酸化は顕著に抑制されることが示され、WSRK の下流における標的因子であることが示唆された。

Wax ester fermentation is one of unique metabolic processes in *Euglena gracilis*. Enzymes involved in this metabolic pathway have already been identified, but the regulatory mechanism of wax ester metabolism in response to anaerobic conditions remains largely unknown. Recently, we have succeeded in identifying a novel protein kinase termed WSRK (Wax ester Synthesis Regulation Kinase) as a key regulatory factor for anaerobic wax-ester metabolism. In addition, our previous phospho-proteomics analysis suggested a possibility that WSRK could affect phosphorylation state of pyruvate:$NADP^+$ oxidoreductase (PNO), a peculiar wax-ester metabolic enzyme which catalyzes a reaction from pyruvate to acetyl-CoA in mitochondria. In this study, we have evaluated the effect of WSRK gene silencing on phosphorylation state and enzyme activity of PNO in *E. gracilis*. Immunoblot analysis clearly showed that PNO phosphorylation state reduced significantly in WSRK gene silenced *E. gracilis* cells, suggesting PNO as a down-stream target factor of WSRK.

Euglena, Phosphorylation, Post-translational modification

発表責任者：駒井陽輔（n19m809@matsu.shimane-u.ac.jp）

講演番号：2A06-09
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 13:00～ ミーティングルーム A

分裂酵母における窒素源としてのアミノ酸選択機構の解析

Research on the preference of amino acid as nitrogen source in fission yeast

○田渕 稔二[1]、西村 慎一[1,2]、松山 晃久[1,3]、吉田 稔[1,2,3,4]（[1]東大院農・応生工、[2]東大・微生物イノベ、[3]理研 CSRS・ケミカルゲノミクス、[4]理研 CSRS・創薬シード）
○TOSHITSUGU TABUCHI[1], Shinichi Nishimura[1,2], Akihisa Matsuyama[1,3], Minoru Yoshida[1,2,3,4]
([1]Dept. Biotechnol., Univ. Tokyo, [2]CRIIM, Univ. Tokyo, [3]Chem. Genomics Res. Gr., RIKEN CSRS, [4]Drug Discov. Seed Cpd. Exploratory Unit, RIKEN CSRS)

細胞は環境中の栄養素を感知し、それにより遺伝子発現や代謝経路を変化させることで環境に適応する。この時、利用する栄養素には優先性がみられ、分裂酵母では培地中に高濃度の塩化アンモニウムと分岐鎖アミノ酸が存在する場合、分岐鎖アミノ酸の細胞内への取り込みは抑制される。このようにより好ましい窒素源を優先的に利用するために他の窒素源の利用を抑制するシステムを窒素カタボライト抑制と呼ぶ。しかしながら分裂酵母がどのような栄養素を感知しどのように代謝経路を変更するのか、その現象とメカニズムには未解明な部分が多い。

我々はカタボライト抑制を引き起こす栄養素の組み合わせを解析する過程でアミノ酸間にも取り込みを指標にした相互作用が存在することを見出した。分裂酵母のロイシン要求性株（*leu1-32*）を用いて、ロイシンの利用を妨げるアミノ酸を探索した結果、いくつかのアミノ酸存在下でロイシン要求性株の生育の遅延が観察された。特にメチオニンはそれ自身は窒素源として利用されにくいにもかかわらず、顕著な生育阻害を示した。我々は現在、本現象を分子レベルで明らかにするため、ロイシンの取込みに関与しているトランスポーターの探索を進めている。すなわち各種の遺伝子破壊株の生育試験と mRNA 発現量の解析により、関与する遺伝子候補を見出した。本発表では、新しいアミノ酸間の相互作用とその分子メカニズムの解析について報告する。

Cells have an ability to adapt to the environment by changing gene expression and metabolic pathways. Fission yeast senses nutrition species, such as nitrogen source, in the medium. Cells have preferred nitrogen source, by which cellular uptake of less preferred nitrogen source is inhibited. This is called nitrogen catabolite repression (NCR). For example, ammonium ion is preferred than branched chain amino acids as a nitrogen source.

To analyze the molecular mechanism underlying NCR phenomena, we screened for amino acids that suppress leucine utilization by using a leucine auxotrophic *leu1-32* strain. As a result, we identified several amino acids that inhibited the growth of *leu1-32* cells even in the presence of leucine. Importantly, they were not always preferred but poor nitrogen sources. Among the amino acids identified, methionine showed the most potent growth inhibition. Currently, we are trying to identify leucine transporters whose function is suppressed in the presence of methionine. In this presentation, we will report the new interactions among amino acids and their plausible mechanisms.

fission yeast, amino acid, metabolic control

発表責任者：田渕稔二（tabuchi-toshitsugu357@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2A06-10
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 13:00～ ミーティングルーム A

分裂酵母および出芽酵母の Pos5 が CoQ 生合成に影響する

Pos5 affects CoQ biosynthesis in *S. pombe* and *S. cerevisiae*

○西原 昇瑚[1]、西田 郁久[2,3]、柳井 良太[2]、松尾 安浩[1,2,4]、戒能 智宏[1,2,4]、川向 誠[1,2,4]（[1]島根大院・自然科学、[2]島根大・生物資源、[3]新潟大・日本酒学、[4]島根大・農生命科学系）

○Shogo NISHIHARA[1], Ikuhisa NISHIDA[2,3], Ryota YANAI[2], Yasuhiro MATSUO[1,2,4], Tomohiro KAINO[1,2,4], Makoto KAWAMUKAI[1,2,4] ([1]Grad. Sch. of Nat. Sci. and Tech., Shimane Univ., [2]Fac. of Life and Environ. Sci., Shimane Univ., [3]Sakeol. Ctr., Niigata Univ. (SCNU), [4]Inst. of Agricul. and Life Sci., Shimane Univ.)

コエンザイム Q（CoQ, ユビキノン）は電子伝達系の必須因子である。当研究室では、これまでに CoQ_{10} を生合成する分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* の 10 個の CoQ 生合成酵素遺伝子を同定してきた。CoQ のキノン骨格は、水酸化、メチル化、脱炭酸化が行われるため、様々な基質や補酵素が必要と考えられるが、その詳細は不明な点が多い。そこで、分裂酵母の遺伝子破壊株ライブラリーにあるミトコンドリア関連遺伝子の破壊株を用いて CoQ_{10} 量の測定を行い、CoQ 生合成に関与する遺伝子の探索を行った。その結果、CoQ_{10} 量が野生株の約 0.2 倍に減少していた *Δpos5* 株を見出した。

分裂酵母の Pos5 と相同性がある出芽酵母 *S. cerevisiae* の Pos5p（ScPos5p）は、活性測定や構造解析から NADH キナーゼと同定されている。そこで、*ΔScpos5* 株の CoQ_6 量を測定したところ、細胞数あたりでコントロール株の約 0.5 倍に低下しており、出芽酵母でも Pos5 が CoQ 生合成に関与することが示唆された。次に *ScPOS5* を分裂酵母の *Δpos5* 株に導入し相補試験を行ったところ、細胞数あたりの CoQ_{10} 量が野生株の約 0.9 倍に回復していたことから、分裂酵母の Pos5 が NADH キナーゼとしての機能をもつことが示唆された。

CoQ 生合成の水酸化反応を触媒する Coq6 の反応には、NAD(P)H が関与していることが示唆されている。そこで、*Δcoq6* 株の CoQ 生合成を回復させるバニリン酸を添加して *Δpos5* 株の CoQ_{10} 量を測定した。その結果、0.5 mM バニリン酸存在下における細胞数あたりの CoQ_{10} 量は、非存在下の約 1.7 倍に増加していた。このことから、Pos5 がキノン骨格の水酸化反応に関与していることが示唆された。

Coenzyme Q (CoQ) is an essential component of the electron transport, and ten genes involved in *Schizosaccharomyces pombe* CoQ biosynthesis have been identified in our laboratory. To identify the novel genes for CoQ biosynthesis, we screened the Bioneer deletion library, and found *Δpos5* strain produced 0.2-fold decreased CoQ content. Pos5 shares homology with *S. cerevisiae* Pos5 (ScPos5), which was reported as a NADH kinase. CoQ_6 contents in *ΔScpos5* was decreased to 0.5-fold compared to control strain, suggesting that ScPos5 is related to CoQ biosynthesis. Next, we constructed the *Δpos5* harboring the *Scpos5* gene, and this strain recovered the CoQ content to 0.9-fold of the wild type.

Coq6 is monooxygenase that is thought to utilize NAD(P)H. Vanillic acid (VA) recovered the growth delay in minimal medium and defect of CoQ production in *Δcoq6* strain. Addition of 0.5 mM VA increased CoQ content to 1.7-fold in *Δpos5* strain. These results indicated that Pos5 involved in CoQ biosynthesis in yeasts.

Coenzyme Q, Fission yeast, NADK kinase

講演番号：2A06-11
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 13:00～ ミーティングルーム A

安息香酸は分裂酵母のコエンザイム Q 生合成を顕著に阻害する

Benzoic acid significantly inhibits Coenzyme Q biosynthesis in Schizosaccharomyces pombe

○西田 郁久[1,2]、柳井 良太[1]、松尾 安浩[1,3]、戒能 智宏[1,3]、川向 誠[1,3] ([1]島根大生物資源、[2]新潟大日本酒学、[3]島根大農生命系)
○ Ikuhisa NISHIDA[1,2], Ryota YANAI[1], Yasuhiro MATSUO[1,3], Tomohiro KAINO[1,3], Makoto KAWAMUKAI[1,3] ([1]Fac. of Life and Environ. Sci., Shimane Univ., [2]Sakeol. Ctr., Niigata Univ. (SCNU), [3]Inst. of Agric. and Life Sci., Shimane Univ.)

コエンザイム Q（CoQ、ユビキノン）は多くの好気性生物において、呼吸鎖電子伝達系の必須因子として機能する。分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* やヒトはイソプレノイド側鎖単位が 10 の CoQ_{10} を生合成するが、我々は CoQ_{10} 生合成経路の解明とその生産性向上を目指している。本研究では、*S. pombe* が CoQ_{10} の前駆物質として *p*-ヒドロキシ安息香酸（PHB）だけではなく *p*-アミノ安息香酸（PABA）も利用することを明らかにした。次に、CoQ_{10} の生産性に影響を与える化合物を探索したところ、5 μg/mL 以上の安息香酸（Bz）添加により CoQ 生合成が顕著に阻害されることを見出だした。この阻害は、Bz よりも 10 倍低濃度の PABA もしくは PHB の同時添加により抑圧された。また、PHB-ポリプレニル基転移酵素をコードする *ppt1* (*coq2*)の過剰発現株において Bz による CoQ 生合成の阻害が緩和された。さらに、ヒトの *COQ2* を過剰発現する *S. pombe* の *ppt1* (*coq2*)破壊株においても Bz は CoQ_{10} 生合成を阻害し、またこの菌株でも PABA が CoQ_{10} の前駆物質として利用されることを見出だした。このため、Bz は Coq2 によって触媒される PHB や PABA へのプレニル化反応を阻害することが示唆された。加えて、Coq4 の発現解析より、Bz が CoQ 生合成複合体を不安定化させることも推察された。

Coenzyme Q (CoQ, ubiquinone) is an essential component of the electron transport system in aerobic organisms. Human type CoQ_{10}, which has 10 units of isoprene in its quinone structure, is especially valuable as a food supplement. Therefore, studying the biosynthesis of CoQ_{10} is important not only for increasing metabolic knowledge, but also for improving biotechnological production. Herein, we show that *Schizosaccharomyces pombe* utilizes *p*-aminobenzoate (PABA) in addition to *p*-hydroxybenzoate (PHB) as a precursor for CoQ_{10} synthesis. We explored compounds that affect the synthesis of CoQ_{10} and found benzoic acid (Bz) at a concentration of 5 μg/mL or higher significantly inhibited CoQ biosynthesis without accumulation of apparent CoQ intermediates. This inhibition was counteracted by incubation with a 10-fold lower amount of PABA or PHB. Overexpression of PHB-polyprenyl transferase encoded by *ppt1* (*coq2*) also overcame the inhibition of CoQ biosynthesis by Bz. Bz also inhibited a *S. pombe ppt1* (*coq2*) deletion strain expressing human *COQ2*, and this strain also utilized PABA as a precursor of CoQ_{10}. Thus, Bz is likely to inhibit prenylation reactions involving PHB or PABA catalyzed by Coq2. Moreover, the expression of Coq4, which acts as a central organizer of CoQ biosynthetic enzyme complex, was significantly reduced, suggesting that Bz destabilizes this complex.

Benzoic acid, CoQ, Ubiquinone

発表責任者：西田郁久（i-nishida@sake.nu.niigata-u.ac.jp）

講演番号：2A06-12
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 13:00～ ミーティングルーム A

ジャーファーメンターを用いた低酸素培養における G-body 形成条件の検討

Investigation of G-body formation conditions in hypoxic culture using a jar fermenter

○村田 有紀、三浦 夏子、片岡 道彦（大阪府大生命環境）
○Yuki MURATA, Natsuko MIURA, Michihiko KATAOKA (Osaka Prefecture Univ.)

G-body とは Glycolytic body の略称であり、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を低酸素条件下で培養した際に、解糖系酵素エノラーゼ(Eno2p)等の代謝酵素が代謝経路を調節するために形成する、タンパク質集合体である(1, 2)。先行研究において、様々なスケールでの低酸素培養により G-body 形成が確認された。しかし、通気量の調節や大量培養が可能なジャーファーメンターを用いた低酸素培養や G-body 形成についての検証は行われていない。そこで本研究では、ジャーファーメンターで低酸素培養を行い、多くの G-body 形成酵母細胞を確認することができる培養通気条件を決定することを目的とした。使用した株は、酵母のエノラーゼ集合を GFP の蛍光によって確認できる ENO2-GFP 株である。まず、通気する気体中の空気(Air)と窒素(N_2)の割合を検討した。次に、ENO2-GFP 株を 300 mL 容ミニジャーファーメンター（サンキ精機社製）で 10 時間培養し、この間、1 時間ごとに非破壊・非接触酸素計 OXY-1 SMA Trace（PreSens 社製）を用いた溶存酸素測定を行った。また、2 時間ごとにサンプリングを行い、サンプルを用いて生育度測定と顕微鏡観察を行った。さらに、撮影した顕微鏡写真から G-body 形成率を算出した。培養の結果から、ジャーファーメンター培養における溶存酸素濃度と G-body 形成効率の関係について考察したのでまとめて発表する。

G-body is the assembly composed of various proteins including glycolytic enzymes, such as enolase (Eno2p), and is considered to regulate metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* cells under hypoxia (1, 2). In the previous studies, G-body formation was confirmed in various small-scale culture. However, examination of G-body formation by using a jar fermenter which enables large-scale culture in addition to controlling ventilation conditions has not been conducted. In the present study, we tested whether the ventilation conditions affect G-body formation by using a jar fermenter. We used ENO2-GFP strain visualized Eno2p by GFP. We cultivated ENO2-GFP strain in a mini-jar fermenter in several ventilation conditions for 10 h and measured dissolved oxygen level hourly by the oxygen analyzer, OXY-1 SMA Trace (Presence). To calculate G-body formation ratio, we took samples every two hours and conducted microscopic observation. In the presentation, we discuss correlations between dissolved oxygen levels and G-body formation rates in hypoxic culture using a jar fermenter.

(1) Miura et al. 2013 *Eukaryotic Cell*; (2) Jin et al. 2017 *Cell Reports*

G-body, Hypoxia, Jar fermenter

発表責任者：三浦夏子（miura.natsuko@biochem.osakafu-u.ac.jp）

講演番号：2A06-13
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 13:00～ ミーティングルーム A

出芽酵母アルコールデヒドロゲナーゼの G-body 局在化シグナル配列（GFoS-tag）による細胞代謝調節効果の検証

Investigation of metabolic regulation effect of GFoS-tag fused with alcohol dehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae*

○内海 亮太郎、吉村 柚紀、三浦 夏子、片岡 道彦（阪府大院生命環境）
○ Ryotaro UTSUMI, Yuki YOSHIMURA, Natsuko MIURA, Michihiko KATAOKA (Osaka Prefecture Univ.)

酵母は低酸素下において、解糖系酵素などがつくるタンパク質集合体である G-body を形成して代謝調節を行う(1,2)。我々は以前の研究で、G-body 構成酵素の一つであるエノラーゼ（Eno2p）のアミノ酸配列断片化により、蛍光タンパク質を G-body に局在化させることができるシグナル配列(GFoS-tag)を見出した(1)。そこで、本研究ではエタノール合成酵素の主要なアイソザイムであるアルコールデヒドロゲナーゼ（Adh1p）をモデルとし、シグナル配列を用いて特定の酵素を G-body に組み込むことが出来るかを検証した。具体的には既知のシグナル配列と *ADH1* 配列をベクタープラスミドに組み込み、酵母に導入して G-body 様の局在変化を示すか確認した。局在変化は、シグナル配列および *ADH1* 配列と融合発現した FusionRed を蛍光顕微鏡 BZ-9000（Keyence）で観察し、顕微鏡の視野内に捉えた 100～300 細胞のうち、局在変化を示した細胞の割合を数値化して確認した。次に、Adh1p の G-body 局在化に伴うグルコース代謝産物の変化について解析した。以上より、GFoS-tag を用いた酵素の局在調節が細胞代謝に与える影響について考察したので、まとめて発表する。

The budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* is considered to regulate glucose metabolism under hypoxia by forming G-body, a membrane-less organelle composed of proteins including glycolytic enzymes such as enolase (Eno2p) (1, 2). In the previous study, we found a signal sequence (GFoS-tag) that can localize fluorescent proteins to the G-body by fragmenting the amino acid sequence of Eno2p (1). In this study, we tested whether alcohol dehydrogenase (Adh1p), which is the main isozyme of ethanol synthase, can be incorporated into G-body using GFoS-tag. To confirm whether they localized to G-body under hypoxia, Adh1p fused with GFoS-tag and the fluorescent protein FusionRed was produced in *S. cerevisiae* BY4741 cells. The cells were observed with a fluorescence microscope BZ-9000 (Keyence), and the percentage of cells having GFoS-tag-Adh1p-FusionRed localized to G-body was counted. We further analyzed changes in glucose metabolites associated with G-body localization of Adh1p. Based on the results, we have considered the effects of enzyme localization regulation using GFoS-tag on cell metabolism.

(1) Miura et al. 2013 E*ukaryotic Cell*. (2) Jin et al. 2017 *Cell Reports*.

G-body, Saccharomyces cerevisiae, GFoS-tag

発表責任者：三浦夏子（miura.natsuko@biochem.osakafu-u.ac.jp）

講演番号：2A06-14
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 13:00～ ミーティングルーム A

生体触媒による光学活性ブテノライドの合成

Biocatalytic synthesis of optically active butenolides

櫻井 篤、石井 修介、川島 丈、吉富 翔悟、○冨宿 賢一 (明星大理工)
Atsushi SAKURAI, Shuusuke ISHII, Jo KAWASHIMA, Shogo YOSHITOMI, ○ Ken-ichi FUHSHUKU (Meisei Univ.)

【目的】2-ブテノライド（α,β-不飽和-γ-ブチロラクトン）は、数多くの生物活性天然有機化合物に含まれる構造であり、特に、4-位に置換基が導入された場合には光学活性体として存在する。このことから、2-ブテノライドを効率的かつ立体選択的に合成する方法を開発することは、有機合成の発展した現在においても非常に重要である。本研究では、生体触媒を利用して各種の光学活性な 2-ブテノライドを合成する新しい不斉反応を開発することを目的として、生体触媒によるエナンチオ面選択的な不斉プロトン化反応に着目した。
【方法】市販のα-アンゲリカラクトンを基質として、エナンチオ面選択的に不斉プロトン化し、光学活性なβ-アンゲリカラクトンへと変換する微生物をスクリーニングした。微生物を液体培養後、集菌と洗浄、破砕により無細胞抽出液を調製後、この無細胞抽出液を用いて酵素反応を行い、そのエナンチオ面選択的な不斉プロトン化活性を HPLC 分析により評価した。高いエナンチオ面選択性を示した微生物については、反応条件や基質特異性を精査した。
【結果】スクリーニングの結果、α-アンゲリカラクトンの不斉プロトン化反応を触媒する数種類の微生物を見出した。その中でも特に、酵母の一種 *Ogataea polymorpha* NBRC 1476 が、α-アンゲリカラクトンに対し高い活性を示し、高いエナンチオ面選択性にて光学活性な(*S*)-β-アンゲリカラクトンを生成することを見出した。現在は、反応条件や基質特異性を精査し、各種の光学活性な 2-ブテノライドの合成を検討している。

In this study, we focused on a biocatalytic asymmetric protonation reaction to develop a new method for the asymmetric synthesis of optically active 2-butenolides. We screened for microorganisms capable of asymmetric protonation of commercially available α-angelicalactone as a substrate and conversion to an optically active β-angelicacactone. By the screening for various microorganisms, some microorganisms were found to catalyze the asymmetric protonation of α-angelicalactone with high enantiofacial selectivity to produce an optically active β-angelicalactone. Among them, we chose to investigate the method to synthesis of optically active 2-butenolides using *Ogataea polymorpha* NBRC 1476, a yeast strain, which could show both high reactivity and enantiofacial selectivity. Currently, we are working on the examination of reaction conditions and substrate specificity.

asymmetric protonation, biocatalyst, butenolide

発表責任者：冨宿　賢一（ken-ichi.fuhshuku@meisei-u.ac.jp）

講演番号：2A06-15
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 13:00～ ミーティングルーム A

未殺菌ハチミツから単離された *Zygosaccharomyces siamensis* kiy1 における糖アルコール生産

Polyol production by *Zygosaccharomyces siamensis* kiy1 isolated from non-pasteurized honey.

○岩田 寛[1]、松波 咲代[2]、柏木 豊[2]、前橋 健二[2]、吉川 潤[2] ([1]東農大院応生、[2]東農大応生)
○ Kan IWATA[1], Sayo MATSUNAMI[2], Yutaka KASHIWAGI[2], Kenji MAEHASHI[2], Jun YOSHIKAWA[2] ([1]Grad. Sch. Appl. Biosci., Tokyo Univ. of Agric., [2]Fac. Appl. Biosci., Tokyo Univ. of Agric.)

糖アルコールは、低カロリーや非う蝕性などの有用性から機能性甘味料として広く利用されており、これまでにも耐浸透圧性酵母による複数の生産例が知られている。一方、バイオディーゼル燃料生産の副産物として生じるグリセロールは安価で多量に入手できることから、微生物炭素源として期待されている。そこで、グリセロールを炭素源とした各種食品からの糖アルコール生産酵母の探索、ならびに取得した *Zygosaccharomyces siamensis* kiy1 株のアラビトール生産性について検討した。

高糖濃度食品を主な分離源として 170 株を単離した後、糖アルコール生産菌の選抜を行ったところ、ハチミツより単離した 9 株がアラビトールを生産した。これら生産株は ITS 配列の相同性から 7 株が *Z. siamensis* に、2 株が *Candida magnoliae* に類縁であると示唆された。その中で *Z. siamensis* は糖アルコール生産の報告例がないため、*Z. siamensis* kiy1 株を用いてアラビトール生産の検討を行った。本菌は 200 g/L のグリセロールで培養した時に 15.0 g/L のアラビトールを生産した。一方でグルコース培養においては 200 g/L から 60.8 g/L と高濃度で生産した。炭素源の種類としてグリセロールよりもグルコースやフルクトースを用いた方がよりアラビトールを生産した。このことから炭素源をグルコースに変更し、より効果的にアラビトールを生産する培養条件を検討した。また、本菌の糖アルコール生産に関する代謝経路についても考察する。

Sugar alcohols are widely used as functional sweeteners because of low calorie and non-cariogenicity. There have been several studies on the production of sugar alcohols by osmotolerant yeasts. Meanwhile, Glycerol is produced as a byproduct of biodiesel manufacturing, and is inexpensive and available in large quantities. In this study, we searched for sugar alcohol-producing yeasts from various foods using glycerol as a carbon source, and examined the arabitol productivity of *Zygosaccharomyces siamensis* kiy1, which has not been reported to produce sugar alcohols.

Z.siamensis kiy1 produced 60.8 g/L of arabitol from 200 g/L of glucose as a carbon source. The productivity was higher than that from glycerol (15.0 g/L) Therefore, we changed the carbon source to glucose and examined the culture conditions for more effective production of arabitol. In addition, we focus on the metabolic pathways in the yeast involved in sugar alcohol production.

Zygosaccharomyces siamensis, sugar alcohol, osmotolerant yeast

発表責任者：吉川　潤（jy207183@nodai.ac.jp）

講演番号：2A06-16
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 13:00～ ミーティングルーム A

酢酸を生成するメタン資化細菌 *Methylocaldum marinum* S8 と非メタン資化細菌の共生系

Co-culture of acetate producing methanotroph, *Methylocaldum marinum* S8 and non-methanotrophic bacteria

○竹内 美緒[1]、尾崎 遥[2]、平岡 聡[3]、鎌形 洋一[1]、坂田 将[1]、吉岡 秀佳[1]、岩崎 渉[4]([1]産総研、[2]筑波大、[3]海洋開発機構、[4]東京大学)
○ Mio TAKEUCHI[1], Haruka OZAKI[2], Satoshi HIRAOKA[3], Yoichi KAMAGATA[1], Susumu SAKATA[1], Hideyoshi YOSHIOKA[1], Wataru IWASAKI[4] ([1]AIST, [2]Tsukuba Univ., [3]JAMSTEC, [4]Univ. Tokyo)

メタン資化細菌は、メタンを唯一の炭素･エネルギー源として増殖する細菌である。しばしば他の細菌と共生しているが、一般的には、メタンから生じるメタノールが体外に排出され、メタノール資化細菌がそれを利用していると考えられている。我々は、海底堆積物からメタン資化細菌、*Methylocaldum marinum* S8、ならびに S8 株とメタンのみを炭素源として共生系を構築する通性メタノール資化細菌である *Methyloceanibacter caenitepidi* Gela4 を新規に分離した。メタンのみを炭素源とする共生系における Gela4 株、ならびに単独でメタノールを炭素源として培養した Gela4 株について発現遺伝子比較解析を行ったところ、予想に反し、共生系では acetyl-CoA synthetase 遺伝子の発現量が高くなった。また、共生系と S8 株単独培養系において代謝産物分析を行った結果、メタノール濃度はいずれも低く、酢酸が検出されたことから、S8 株と Gela4 株の共生系においては、酢酸が主なクロスフィーディング物質であることが示唆された。また、S8 株単独培養系と共生系において、酸素濃度が代謝産物に与える影響を評価するため、好気条件（酸素濃度 > 20%）、微好気条件（酸素濃度 < 6%）を保った培養を行った。その結果、好気・微好気いずれにおいても最大 150 μM を超える酢酸生成が確認され、これまでに微好気条件でのみ酢酸を排出することが知られている *Methylomicrobium alcaliphilum* 20Z と異なり、S8 株は好気条件においても酢酸を排出することが明らかになった。また、いずれの条件においても共生系では有意に酢酸濃度が低くなり、共生系では酢酸が消費されていると考えられた。さらに、酢酸を利用し、メタノールを利用できない *Cupriavidus necator* と S8 株によるメタンのみを炭素源とした人為的共生系が確立可能であることが確認されたことから、メタンから酢酸を生成するメタン資化細菌と酢酸利用細菌の共生系は、メタンからの新規物質生産技術開発につながる可能性があると考えられた。

参考文献

Takeuchi et al. (2014) *Methylocaldum marinum* sp. nov., a thermotolerant,methane-oxidizing bacterium isolated from marine sediments, and emended description of the genus *Methylocaldum*. Int J System Evol Microbiol. 64: 3240-3246.

Takeuchi et al. (2019) Possible cross-feeding pathway of facultative methylotroph *Methyloceanibacter caenitepidi* Gela4 on methanotroph *Methylocaldum marinum* S8. PLoS ONE 14(3): e0213535.

methanotroph, co-culture, methane

発表責任者：竹内美緒（takeuchi-mio@aist.go.jp）

講演番号：2B02-01
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 09:30～ ミーティングルーム B

ゲノム編集システムを用いたクエン酸生産糸状菌におけるミトコンドリア局在型クエン酸輸送体遺伝子ノックアウト株の作製と性能評価

Properties of knock-out strains generated by the genome editing system in relation to genes encoding mitochondrial organic acid transporter proteins in citric acid-producing *Aspergillus tubingensis* WU-2223L

○大浦 智之、吉岡 育哲、脇本 紗梨、桐村 光太郎（早大院先進理工）
○Tomoyuki OURA, Isato YOSHIOKA, Sari WAKIMOTO, Kohtaro KIRIMURA (Graduate school of Advanced Science and Engineering, Waseda University)

【目的と背景】

Aspergillus tubingensis WU-2223L は 100 g/L 以上のグルコースやスクロースを消費し、50%(w/w) を超える収率でクエン酸を高生産する。WU-2223L 株ではクエン酸生産条件下でミトコンドリアに局在するクエン酸輸送体 CTPA（クエン酸／リンゴ酸輸送体）と COCA（クエン酸／2-オキソグルタル酸輸送体）の遺伝子が転写されている。本研究では、ゲノム編集を利用して *ctpA* および *cocA* ノックアウト株と二重ノックアウト株を作製し、クエン酸生産に関わる性能を評価した。

【方法と結果】

cocA ノックアウトは遺伝子破壊の結果 [1]と同様にクエン酸生産量を激減させた（12 日間で 16.4 g/L, 73.1％ 減少）。COCA はクエン酸高生産に寄与する輸送体であることが再確認されたが、生産量は低下したもののクエン酸が生産されることから、他のクエン酸輸送体の寄与を示唆した。そこで、*cocA* ノックアウト株を宿主に培養初期のクエン酸生産に寄与する *ctpA* [2] をノックアウトした。*cocA* と *ctpA* の二重ノックアウト株は最少寒天培地で著しい生育遅延を示したが、2-オキソアジピン酸またはリシン、酢酸ナトリウムの添加により生育が回復した。また、*cocA, ctpA* 二重ノックアウト株のクエン酸生産量は、*cocA* 単体のノックアウト株に比べてさらに減少した。すなわち、*cocA* ノックアウト株では *cocA* の欠損を部分的に *ctpA* が相補していることを明らかにした。

Aspergillus tubingensis WU-2223L is a citric acid (CA) hyperproducing filamentous fungus, which produces CA with high yield (>50% (w/w)) based on supplied carbohydrates. In this study, we generated knock-out strains in relation to the genes encoding mitochondrial citrate transporter CTPA (malate-citrate shuttle) [1] and COCA (2-oxoglutarate-citrate shuttle) [2] by the genome editing system. The *cocA*-knockout strain exhibited the decreased CA production (16.4 g/L; decrease by 73.1 %), but CA production still remained. Then, we generated the double knock-out strains of *cocA* and *ctpA*. The representative double knock-out strain exhibited slight growth on minimal agar medium but recovered growth when 2-oxoadipate, lysine or acetate was added. Moreover, the amount of CA produced by the double knock-out strain was significantly lower than that produced by *cocA* knock-out strain. These results suggest that *ctpA* complements partially the defect of *cocA* in the *cocA* knock-out strain.

[1] K. Kirimura *et al*., *Biosci. Biotechnol. Biochem*., **2019**, 83, 1538-1546.
[2] K. Kirimura *et al*., *Biosci. Biotechnol. Biochem*., **2016**, 80, 1737-1746.

Aspergillus tubingensis, citrate-oxoglutarate shuttle protein, citric acid production

講演番号：2B02-02
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 09:30～ ミーティングルーム B

白麹菌における α-アミラーゼ AmyB の機能解析

Analysis of α-amylase AmyB in the white koji fungus Aspergillus luchuensis mut. kawachii

○山口 正晃[1]、門岡 千尋[2]、奥津 果優[1]、吉﨑 由美子[1]、髙峯 和則[1]、後藤 正利[3]、玉置 尚徳[1]、二神 泰基[1]（[1]鹿大院農林水産、[2]筑波大生命環境、[3]佐賀大農）
○ Masaaki YAMAGUCHI[1], Chihiro KADOOKA[2], Kayu OKUTSU[1], Yumiko YOSHIZAKI[1], Kazunori TAKAMINE[1], Masatoshi GOTO[3], Hisanori TAMAKI[1], Taiki FUTAGAMI[1] ([1]Kagoshima Univ., [2]Tsukuba Univ., [3]Saga Univ.)

【背景と目的】焼酎製造に用いられる白麹菌 *Aspergillus luchuensis* mut. *kawachii* は糖質分解酵素を生産し、原料に含まれるデンプンを単糖レベルに分解する。白麹菌は分泌型の α-アミラーゼとして、中性 α-アミラーゼ（AmyA）と耐酸性 α-アミラーゼ（AsaA）を生産することが知られているが、白麹菌のゲノムにはもう 1 つ分泌型 α-アミラーゼをコードする *amyB* 遺伝子が存在する [1)]。本遺伝子は、転写因子をコードする *amyR* と *prtR*、α-グルコシダーゼをコードする *agdA* の近傍に存在している。また、麹造りの工程におけるトランスクリプトームのデータに基づいて、*amyB* は低いレベルではあるが発現していることが示唆された。本研究は、白麹菌の AmyB について解析した。
【方法と結果】まず、白麹菌において *amyB* 遺伝子を破壊して培養上清の α-アミラーゼ活性を測定したが、顕著な α-アミラーゼ活性の低下は見られなかった。そこで、白麹菌において *amyA* と *asaA* の二重破壊株と *amyA*、*asaA*、*amyB* の三重破壊株を構築した。各株の培養上清の α-アミラーゼ活性を測定した結果、二重破壊株と比較して三重破壊株は α-アミラーゼ活性が低下したことから、AmyB は白麹菌の総アミラーゼ活性に寄与していることが示唆された。次に、Δ*amyA* Δ*asaA* 株において、*amyA* プロモーターの制御下で *amyB* を発現する株を構築した。リアルタイム RT-PCR により Δ*amyA* Δ*asaA* P*amyA*-*amyB* 株はコントロール株と比べて *amyB* を約 20 倍高発現したことを確認した。しかし、Δ*amyA* Δ*asaA* P*amyA*-*amyB* 株の培養上清から AmyB の精製を試みたが、困難であった。このことから、*amyB* の coding sequence を RNA-seq のデータで確認したところ、イントロン予測に誤りがあり、AmyB の C 末端側に GPI アンカーによる修飾を受けることが予測されるアミノ酸配列が存在することが明らかになった。そこで、Δ*amyA* Δ*asaA* P*amyA*-*amyB* 株の菌体から細胞膜画分を調製して α-アミラーゼ活性を測定したところ、コントロール株と比較して約 26 倍高い活性を示した。以上の結果より、AmyB が他の α-アミラーゼとは異なり分泌型酵素ではなく、GPI アンカーにより細胞膜に局在している可能性が示唆された。

The white koji fungus *Aspergillus luchuensis* mut. *kawachii* secretes starch-degrading enzymes such as α-amylases AmyA and AsaA during the production process of shochu. We characterized putative α-amylase AmyB by biochemical and gene disruption/overexpression analyses. Our results implied that AmyB is a plasma membrane-localized α-amylase in the white koji fungus.

1) Futagami, T. et al., *Appl. Environ. Microbiol.*, 2015;81:1353-63.

koji, Aspergillus, amylase

講演番号：2B02-03
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 09:30～ ミーティングルーム B

白麹菌における MAP キナーゼを介したクエン酸生産制御機構の解析

Analysis of MAP kinases in the white koji fungus *Aspergillus luchuensis* mut. *kawachii*

○池田 萌[1]、門岡 千尋[2]、奥津 果優[1]、吉﨑 由美子[1]、髙峯 和則[1]、後藤 正利[3]、玉置 尚徳[1]、二神 泰基[1] ([1]鹿大院農林水産、[2]筑波大生環、[3]佐賀大農)
○ Moe IKEDA[1], Chihiro KADOOKA[2], Kayu OKUTSU[1], Yumiko YOSHIZAKI[1], Kazunori TAKAMINE[1], Masatoshi GOTO[3], Hisanori TAMAKI[1], Taiki FUTAGAMI[1] ([1]Kagoshima Univ., [2]Tsukuba Univ., [3]Saga Univ.)

【背景と目的】焼酎製造に用いられる白麹菌 *Aspergillus luchuensis* mut. *kawachii* は、多量のクエン酸を生産することで醪の雑菌汚染を防ぐ役割をもつ。先行研究において、クエン酸の分泌にはクエン酸輸送体 CexA が必要であり、*cexA* の遺伝子発現は推定メチルトランスフェラーゼ LaeA により制御されることを報告した [1)]。しかし、LaeA の上流にある制御因子については明らかになっていない。モデル糸状菌 *Aspergillus nidulans* では、LaeA の発現に MAP キナーゼ MpkB が関与することが報告されている [2)]。そこで本研究では、白麹菌における MAP キナーゼとクエン酸生産制御機構の関連性について解析した。

【方法と結果】まず、白麹菌において MAP キナーゼをコードする *mpkA*、*mpkB*、および *mpkC* の破壊株を構築し、表現型を観察した。*mpkA* 破壊株と *mpkB* 破壊株は最少培地において 30℃で培養した際にコントロール株よりも顕著に生育が遅延した。次に、*mpkA* 破壊株は、高温ストレス（37℃、42℃）、浸透圧ストレス（0.8 M NaCl あるいは 0.6 M KCl）、細胞壁合成阻害ストレス（コンゴレッド、カルコフルオロホワイト、あるいはミカファンギン）に対してコントロール株よりも高感受性を示した。このことから、白麹菌において MpkA は熱ストレス応答、浸透圧応答、ならびに細胞壁合成・維持機構に関与することが示唆された。次に、菌体重量あたりのクエン酸生産量を測定した結果、*mpkA* 破壊株および *mpkB* 破壊株はクエン酸生産量が有意に減少した。さらに、クエン酸輸送体遺伝子 *cexA* の転写量をリアルタイム RT-PCR により解析したところ、*mpkA* 破壊株および *mpkB* 破壊株において *cexA* の発現量が有意に減少していた。以上の結果より、白麹菌において MpkA および MpkB は *cexA* の遺伝子発現制御を介してクエン酸生産に関与する可能性が示唆された。

The white koji fungus *Aspergillus luchuensis* mut. *kawachii* secretes a large amount of citric acid by the citrate exporter CexA during the production process of shochu. The expression of *cexA* is regulated by a putative methyltransferase LaeA[1)]. In addition, the disruption of mitogen-activated protein (MAP) kinase encoding *mpkB* reduced the expression of *laeA* in *Aspergillus nidulans*[2)]. In this study, we showed that the citric acid productivity and gene expression of *cexA* is regulated by MAP kinases MpkA and MpkB in *A. luchuensis* mut. *kawachii*.

1) Kadooka, C. et al., *Appl. Environ. Microbiol.*, 2020;86:e01950-19.
2) Atoui, A. et al., *Appl. Environ. Microbiol.*, 2008;74:3596-3600.

koji, citric acid, *Aspergillus*

発表責任者：二神泰基（futagami@chem.agri.kagoshima-u.ac.jp）

講演番号：2B02-04
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 09:30～ ミーティングルーム B

製麹工程における麹菌 FlbC の発現と酵素遺伝子発現との関わり

Expression of FlbC and enzyme genes in Aspergillus oryzae during koji making

○伊藤 一成[1]、谷野 有佳[1]、五味 勝也[2]、狩山 昌弘[3]、花房 裕子[1]、三宅 剛史[1] ([1]岡山県工技セ、[2]東北大院農・生物産業創成、[3]株式会社フジワラテクノアート)
○Kazunari ITO[1], Yuka TANINO[1], Katsuya GOMI[2], Masahiro KARIYAMA[3], Hiroko HANAFUSA[1], Tsuyoshi MIYAKE[1] ([1]Industrial Technology Center of Okayama Prefecture, [2]Tohoku Univ. of Agric., [3]Fujiwara Techno-Art Co., Ltd)

【目的】我々は製麹工程の再現が可能な新規試験製麹法を構築し、科学的評価が十分でない製麹工程における麹菌の各現象について評価を行っている。この時、既存の品質指標である酵素力価や破精だけでは説明が難しい現象が散見され、未知因子の可能性も否定できない。事実、分生子形成に関わる転写因子 FlbC がグルコアミラーゼ（GlaB）や酸性プロテアーゼ（PepA）などの生産に重要であることが最近報告された。我々は、さまざまな製麹条件に応答して起こる麹菌の細胞内情報を得ることを目指している。今回は、製麹中期以降の *flbC* の発現量と酵素遺伝子および他の関連転写因子の発現量比較について報告する。
【方法・結果】精米歩合 60%の雄町と *Aspergillus oryzae* RIB128 株を用いて、無通風箱培養法で試験製麹を行い、製麹時間ごとの各遺伝子の発現量を qPCR 法により定量した。併せて酵素力価と菌体量も測定した。*flbC* の発現量は、麹菌の生育が活発になり始める製麹中期に高く、その後低下するが後半に再上昇した。分生子形成経路において *flbC* より下流の *brlA* の発現量は、中期は少なく後半に上昇していたため、FlbC が分生子形成とは異なる働きをしていることが示唆された。*pepA* の発現量は *flbC* が高発現している中期で高かったが、後期は激減したため、*pepA* の初期の発現での関わりが予想された。一方、α-アミラーゼ遺伝子の全発現量は大きな変化がなかったが、糖化酵素の発現に関わる *amyR* や抑制する *creA* の発現量は製麹経過とともに上昇傾向であったため、両者のせめぎ合いによるものだと考えられた。また、*glaA* と *glaB* はともに後半にかけて上昇傾向だった。製麹工程において FlbC は、AmyR とは異なった様式での酵素遺伝子発現制御への関わりが推測された。

【Objective】For obtaining intracellular information in *A. oryzae* during *koji* making, we have analyzed the gene expression level of enzymes and factors associated with enzyme production. In this presentation, we describe comparison with the expression level between enzymes and transcription factors every culture time.
【Method and result】The steamed rice inoculated with conidiospores of *A. oryzae* RIB128 strain was incubated in a non-airflow box (NAB) culture method. The gene expression on the time course of *koji* making was analyzed by RT-qPCR. The expression profile of *flbC* was significantly different from that of *brlA*, suggesting role independent of conidiospore development. And, we assumed that FlbC influence enzyme gene production such as acid protease and glucoamylase in *koji* making.

Aspergillus oryzae, transcription factor, koji making

発表責任者：伊藤一成（kazunari_itou@pref.okayama.lg.jp）

講演番号：2B02-05
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 09:30～ ミーティングルーム B

イメージング質量分析を用いた米麹内タンパク質分布の可視化

Visualization of proteins in rice *koji* grains using mass spectrometry imaging

○谷野 有佳[1]、伊藤 一成[1]、五味 勝也[2]、狩山 昌弘[3]、三宅 剛史[1] ([1]岡山県工技セ、[2]東北大院農、[3]株式会社フジワラテクノアート)
○Yuka TANINO[1], Kazunari ITO[1], Katsuya GOMI[2], Masahiro KARIYAMA[3], Tsuyoshi MIYAKE[1] ([1]Industrial Technology Center of Okayama Prefecture, [2]Tohoku Univ., [3]Fujiwara Techno-Art Co., Ltd.)

【目的】清酒の品質には米麹の品質が大きく関与しており、米麹の品質を科学的に評価し、解明することが清酒の品質向上に繋がると考えられる。米麹の品質評価方法として、一般的に酵素活性の測定が用いられてきたが、この方法では米麹粒内での酵素の空間的な分布を知ることができない。また、それ以外の方法として麹菌が蒸米に増殖して白く見える「破精」の観察があるが、この方法では菌糸と米の崩壊による乱反射に由来する白色度を観察しており、麹菌そのものを観察しているわけではない。これまでに米麹内での麹菌由来タンパク質の分布を調べた報告はわずかであるため、本研究では、イメージング質量分析を用いて米麹内の麹菌由来タンパク質分布を評価することにした。
【方法・結果】米麹を用いて凍結切片 (10 μm 厚) を作成し、ポジティブイオンモードでイメージング質量分析を行った。マトリックスはシナピン酸を使用した。麹菌が産生する酵素等の高分子量のタンパク質の測定を行ったが、捉えることはできなかった。そのため、低分子量タンパク質の範囲で測定を行った。その結果、4 つの米麹特異的なシグナル (*m/z* 4,660、6,140、8,170、11,840) が検出され、それらの分布は米麹の破精の部分と一致していた。この米麹特異的なタンパク質を同定するため、米麹からタンパク質を抽出し、Tricine-SDS-PAGE に供した。イメージング質量分析と同様に低分子量領域に米麹特異的なバンドが 4 つ確認され、そのうち 2 つがイメージング質量分析における *m/z* 4,660、11,840 のタンパク質と一致すると考えられた。*m/z* 11,840 のタンパク質の N 末端アミノ酸配列を調べた結果、α-アミラーゼの N 末端側の配列と一致したことから、*m/z* 11,840 のタンパク質は断片化したα-アミラーゼであると考えられた。
[Objective] The quality of rice *koji* greatly affects the process of fermentation and the quality of resulted sake. Therefore, scientific evaluation of the quality of rice *koji* is important. Since there are a few reports that reported the distribution of proteins such as enzymes produced from *Aspergillus oryzae*, in this study, we tried to visualize proteins produced in rice *koji* using mass spectrometry imaging.
[Methods and Results] Although we failed to visualize the enzymes because of difficulty detecting high molecular weight proteins, we achieved to visualize low molecular weight proteins in rice *koji*. Proteins at *m/z* 4,660, 6,140, 8,170, and 11,840 were found to be specific to *koji* and they distributed at the area of *haze*. Among them, the protein at *m/z* 11,840 was identified to N-terminal fragment of α-amylase protein.

rice *koji*, mass spectrometry imaging, fragmentation of α-amylase

発表責任者：谷野　有佳（yuka_tanino@pref.okayama.lg.jp）

講演番号：2B02-06
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 09:30～ ミーティングルーム B

c-di-GMP の合成促進による電気化学活性バイオフィルムの活性化

Activation of electrochemically active biofilm by promoting the synthesis of c-di-GMP

○松元 陽歩、高妻 篤史、渡邉 一哉（東薬大生命）
○Akiho MATSUMOTO, Atsushi KOUZUMA, Kazuya WATANABE (Tokyo Univ. Pharm. Life Sci.)

【背景と目的】微生物電気化学システム（BES）は電気化学活性細菌（EAB）と電極との電気化学的相互作用を利用したシステムであり、廃水処理や有用物質生産などへの応用が期待されている。BES では EAB が電極上に形成するバイオフィルム（電気化学活性バイオフィルム; EABF）が電気エネルギーと化学エネルギーを相互変換する触媒として作用するため、BES の高性能化には EABF の形成を促進させることが重要である。これまでの研究により、我々は EAB のモデル生物である *Shewanella oneidensis* MR-1 株の EABF 形成において、c-di-GMP 合成酵素（DgcS; SO_1646）が重要な役割を果たすことを明らかにしている。そこで本研究では、MR-1 株の EABF 形成を促進させるため、*dgcS* 過剰発現株（*dgcS*-OE 株）を作製し、バイオフィルム形成量と電流生成量を評価した。
【結果】電気化学フローセルにおいて *dgcS*-OE 株を培養した結果、本株のバイオフィルム形成量および電流生成量は MR-1 野生株と比較して顕著に増加しており、*dgcS* の過剰発現によって MR-1 株の EABF 形成と電流生成を促進できることが示された。*dgcS*-OE 株と野生株の遺伝子発現を DNA マイクロアレイ解析により比較したところ、*dgcS*-OE 株において type IV pili 合成遺伝子や細胞外シトクローム *c* 遺伝子である MtrABC および OmcA の発現量が有意に増加していることが明らかになった。これらの結果は、*dgcS* の過剰発現によって細胞内 c-di-GMP レベルが上昇し、これにより電極への付着および電子伝達に関与する遺伝子の発現が誘導されたことを示唆している。今後は c-di-GMP によるこれらの遺伝子の発現制御機構の解明を目指す予定である。

Bioelectrochemical systems (BESs) have attracted attention as sustainable biotechnology systems. In BESs, biofilms that electrochemically active bacteria (EAB) form on electrodes (electrochemically active biofilms; EABF) serve as catalysts for the interconversion between chemical and electric energy. Enhancement of EABF formation is therefore important for improving the performance of BESs. We previously showed that a diguanylate cyclase, DgcS (SO_1646), plays an important role in EABF formation by a model EAB, *Shewanella oneidensis* MR-1. In the present study, we revealed that a *dgcS*-overexpressing strain (*dgcS*-OE) exhibits enhanced EABF formation and increased current generation in electrochemically flow cells (EFCs). In addition, we found that genes related to type IV pili synthesis and extracellular electron transfer are up-regulated in *dgcS*-OE grown in EFCs. These results indicate that overexpression of *dgcS* results in elevated intracellular c-di-GMP levels, thereby activating the expression of genes involved in attachment and electron transfer to electrodes.

Electrochemically active biofilm, Cyclic di-GMP, *S. oneidensis* MR-1

発表責任者：松元陽歩（s158060@toyaku.ac.jp）

講演番号：2B02-07
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 09:30～ ミーティングルーム B

緑膿菌細胞間コミュニケーションを制御する可動性因子の解析
Insertion sequence in a quorum sensing gene of *Pseudomonas aeruginosa*

○上原 礼佳[1]、須澤 由希[2]、遠矢 正城[2]、吉澤 晋[4]、小暮 一啓[4]、野村 暢彦[1,3]、豊福 雅典[1,3]([1]筑波大・生命環境系、[2]筑波大院・生命環境、[3]筑波大・MiCS、[4]東京大・大気海洋研)
○ Ayaka UEHARA[1], Yuki SUZAWA[2], Masashiro TOYA[2], Susumu YOSHIZAWA[4], Kazuhiro KOGURE[4], Nobuhiko NOMURA[1,3], Masanori TOYOFUKU[1,3] ([1]Fac. Life Environ Sci., Univ. Tsukuba, [2]Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, [3]MiCS., Univ. Tsukuba, [4]AORI., Univ. Tokyo)

Quorum sensing (QS) は微生物間コミュニケーション機構の一つである。微生物制御の重要な標的となっている一方で、本機構が環境中でどのように機能しているかについての知見はほとんどない。当研究室先行研究より、異なる水圏環境から単離された緑膿菌(*Pseudomonas aeruginosa*) の QS システムを解析したところ、外洋域からは QS の機能が一部欠損した株が多く単離された。これらを調べると、QS 欠損株の中には QS 関連遺伝子（*lasR*）に挿入配列（IS）を持つ株が存在し、その株を栄養培地で培養すると集団から二種類のコロニー形態が出現した。

このような興味深い結果が得られた一方で、IS と QS の関係については未解明である。そこで本研究では、環境に応じた QS システムの変遷を理解するために、IS と QS の関係を解析することを目的とした。IS が挿入されていない *lasR* を持つ細胞を単離し、様々な条件で継代培養を行ったところ、*lasR* に IS が挿入された細胞が出現した。このことから、IS は可動性を保持していることが明らかとなった。更に、挿入される IS は複数種存在することが確認された。

本研究で IS による QS の制御機構の一端を明らかにすることで、QS 制御の新たな糸口が得られる可能性がある。

Quorum sensing (QS) is one of the cell-to-cell communication systems in bacteria. While QS has become an important target for microbial control, how QS contribute to the survival of this bacterium in various environments is not fully understood.

In order to get a better insight, we analyzed the QS systems in *P. aeruginosa* isolated from different water environments. Strains isolated from the open ocean were found to be often defective in the QS systems. Interestingly, one of the QS deficient isolates, Ocean-1187, had insertion sequences (IS) in the QS signal receptor gene, *lasR*. When Ocean-1187 was cultured in a rich medium, two kinds of colony morphologies appeared from a single isolate. Furthermore, when Ocean-1187 that possesses an intact *lasR* was subcultured under various conditions, cells with IS inserted in *lasR* appeared. These results suggest that the IS in Ocean-1187 is mobile. Our data shows that different kinds of IS are inserted into *lasR*.

This study will provide a new insight into the regulation of QS by IS, which may lead to new clues for QS regulation.

Quorum sensing, cell-to-cell communication, *Pseudomonas aeruginosa*

講演番号：2B02-08
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 09:30～ ミーティングルーム B

捕食性細菌デロビブリオ属細菌の PQS クォーラムセンシング新規アッセイ法への応用

The application of the predatory bacteria *Bdellovibrio bacteriovorus*: a new bioassay method for PQS quorum sensing system

○星子 裕貴[1]、門上 希和夫[2]、ガルシア・コントレラス ロドルフォ[3]、前田 憲成[1] ([1]九工大院生命体、[2]北九州大環技研、[3]メキシコ国立自治大医)
○Yuki HOSHIKO[1], Kiwao KADOKAMI[2], Rodolfo GARCIA-CONTRERAS[3], Toshinari MAEDA[1] ([1]Kyutech, [2]Kitakyushu Univ., [3]UNAM)

クォーラムセンシング（QS）は、細胞密度を感知し、遺伝子発現などを制御する機構であり、多剤耐性菌である緑膿菌においても、アシルホモセリンラクトン（AHLs）やシュードモナスキノロンシグナル（PQS）などのシグナル分子を使い、病原性因子の発現を調節している。これまで、AHLs のバイオアッセイ法として、*Agrobacterium tumefaciens*や*Chromobacterium violaceum*を遺伝子工学的に改良した菌株を用いた手法が利用されてきたが、同じく毒性因子生産やバイオフィルム形成などに重要な役割を担うPQS系のQSを簡易的、かつ定量的に評価するバイオアッセイ法はこれまで確立されていない。そこで、本研究ではデロビブリオ属細菌の捕食活性がPQS系化合物によって阻害されるという現象を活用した、バイオアッセイを検討した。結果として、宿主を大腸菌として、デロビブリオ属細菌による溶菌活性が、緑膿菌自身、その培養液抽出物、さらにはPQS系化合物によって顕著に阻害されることがわかった。この捕食阻害の度合が、LC-QTOF-MSによる定量測定結果から、PQSとHHQの濃度に依存していることなどが明らかとなり、デロビブリオ属を用いることで、PQS系のQSをバイオアッセイできる可能性が示唆された。

Quorum sensing (QS) plays an important role in bacterial community to regulate gene expression according to the number of cells. QS is known to use many kinds of signals such as acylhomoserine lactones (AHLs), *Pseudomonas* quinolone signal (PQS), and so on. In recent years, some bioassay systems for QS signals should be important to analyze the activity of QS related to the production of virulence factors. Genetically-engineered strains of *Agrobacterium tumefaciens* and *Chromobacterium violaceum* were constructed for the quantitative bioassay of AHLs. On the other hand, a quantitative bioassay system for PQS, related to the production of virulence factors and biofilm formation, has been not established yet. Thus, *Bdellovibrio bacteriovorus*, one of the predatory bacteria, could be useful for a bioassay system for PQS since quinolone signals inhibited the predatory activity of *B. bacteriovorus*. As a result, the predatory activity of *B. bacteriovorus* to *E. coli* as the host cell was inhibited by each colony of *Pseudomonas aeruginosa*, the fraction of quinolone signal extraction from cell culture, and standard solution of quinolone signals. Also, the inhibition level on predatory activity indicated to be dependent on the concentration of quinolone signals measured by using LC-QTOF-MS. Hence, it is suggested to be available to use *B. bacteriovorus* as a new bioassay system for PQS QS system.

Quorum sensing, Predatory bacteria, Bioassay

発表責任者：前田憲成（toshi.maeda@life.kyutech.ac.jp）

講演番号：2B02-09
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 09:30～ ミーティングルーム B

酢酸菌 *Acetobacter pasteurianus* SKU1108 の耐熱化育種株 TH-3 の耐熱化機構解析

Analysis of thermotolerant mechanism in TH-3 strain experimentally evolved from *Acetobacter pasteurianus* SKU1108

○松本 奈実[1]、松谷 峰之介[2]、片岡 尚也[1,3,4]、藥師 寿治[1,3,4]、松下 一信[1,3,4] ([1]山口大院創成科学、[2]東農大ゲノム解析セ、[3]山口大農、[4]山口大中高温微セ)

○ Nami MATSUMOTO[1], Minenosuke MATSUTANI[2], Naoya KATAOKA[1,3,4], Toshiharu YAKUSHI[1,3,4], Kazunobu MATSUSHITA[1,3,4] ([1]Grad. Sch. Yamaguchi Univ., [2]Tokyo Univ. Agric., [3]Fac. Agr. Yamaguchi Univ., [4]RCTMR Yamaguchi Univ.)

耐熱性酢酸菌を用いた発酵技術は、省エネ型の発酵技術として期待されるため、耐熱化酢酸菌の開発及び耐熱化機構の解明が望まれている。私たちは、*Acetobacter pasteurianus* SKU1108 を高温適応育種により生育限界温度が 3˚C 上昇した耐熱化株 TH-3 を取得している[1]。TH-3 株には 11 ヶ所の変異が見出され、その変異のうちアミノ酸輸送体(*aat*)、ジカルボン酸輸送体(*dct*)とウリジル酸転移酵素(*glnD*)遺伝子の変異が耐熱性に寄与することが明らかとなっている[2]。また、TH-3 株では細胞内で特定のアミノ酸濃度が上昇しており、アミノ酸代謝と耐熱性との関連が示唆されている[3]。

今回、耐熱性への寄与が明らかとなっている 3 つの変異を SKU1108 へ導入したΔ*aat* Δ*dct glnD-TH-3* 株を構築し、その評価を行ったところ、TH-3 に近い耐熱性及び高温発酵能を示すとともに細胞内アミノ酸含量も同様に変化することが見出された。また、*Komagataeibacter medellinensis* NBRC 3288 の耐熱化株 ITO-1 で見出された *spoT* 遺伝子への大規模アミノ酸欠損変異（耐熱化に寄与）を SKU1108 に導入した *spoT-ITO-1* 株においても同様の耐熱性の向上と細胞内アミノ酸含量の変動が見られたので、合わせて報告し、耐熱性とアミノ酸代謝について考察する。

Thermotolerant microorganisms are beneficial for industrial fermentation because they facilitate stable fermentation with reduced cooling costs. We obtained thermally adapted strain TH-3 from *Acetobacter pasteurianus* SKU1108 by experimental evolution at high temperature[1]. The fermentation temperature was increased to 3˚C in TH-3 that had 11 mutations. Of those, gene mutations in amino acid transporter (*aat*), dicarboxylate transporter (*dct*) and PII uridylyltransferase (*glnD*) had been shown to be critical for the increased thermotolerance[2]. Moreover, intracellular amino acid pool was largely changed in TH-3, suggesting the relation between amino acid metabolism and thermotolerance[3].

In this study, we constructed Δ*aat* Δ*dct glnD-TH-3* strain, and analyzed thermotolerance and intracellular amino acid contents. Δ*aat* Δ*dct glnD-TH-3* strain showed high thermotolerance and amino acid profile similar to that of TH-3. In addition, *spoT* mutation detected in thermo-adapted strain from *Komagataeibacter medellinensis* NBRC 3288 was introduced into SKU1108. The *spoT-ITO-1* strain also increased thermotolerance and showed similar amino acid profile. We will discuss the thermotolerant mechanism by relating to the amino acid metabolism. This study was supported by JST-ALCA (JST; JPMJAL1106).

[1] Matsutani M et al., *J Biotechnol*, 165, 109 (2013), [2] 谷本ら、農化 2015 年度大会(2A21p13), [3] 上利ら、農化 2019 年度大会(3C1p15)

acetic acid bacteria, adaptation, thermotolerance

講演番号：2B02-10
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 09:30～ ミーティングルーム B

絶対嫌気性菌 *Clostridium acetobutylicum* の酸化ストレス存在下における生育停止機構に関する研究

Mechanisms of growth cessation of the *C. acetobutylicum* under Oxidative stress.

○宇津 智晴、青木 麻由、和泉 翔、川崎 信治 (東京農業大学)
○Tomoharu Utsu, Mayu Aoki, Kakeru Izumi, Shinji Kawasaki (Tokyo University of Agriculture)

[目的]

絶対嫌気性菌は約 150 年前にパスツールによって発見されたが、現在も O_2 による生育阻害の要因は明確でない。当研究室では *Clostridium* 属細菌を用いて本命題の解明を目的とした研究を行っている。ABE 発酵で産業的に利用される *Clostridium acetobutylicum* は、誘導期に低濃度の気相 O_2 を全て消費した後に嫌気条件と同等の生育を示した。また *C. acetobutylicum* は O_2 存在下で生育を停止中に O_2 や活性酸素種(ROS)の水への無毒化を行う機構を持つことが明らかとなった [1)]。このことから、O_2 による生育阻害は細胞死ではなく、生育の一時停止に起因すると推定し研究を進めている。

昨年度の農芸化学大会では、*C. acetobutylicum* に O_2 の副産物である H_2O_2 を添加し培養した際の生育の停止と、その後の回復について報告した。生育停止中の菌体を用いて分子応答解析を行った結果、生育停止中の菌体が生存性を維持すること、およびウェスタンブロッティングにより H_2O_2 添加直後に二つの特異的なタンパク質が消失することを報告した。本講演では O_2 や ROS による生育停止機構の解明を目的として、*C. acetobutylicum* の生育停止中の生理状態に関する解析結果を報告する。

[方法・結果]

対数増殖期初期の *C. acetobutylicum* に O_2 を添加し、Live Dead 染色と FDA 染色を併用したフローサイトメトリーによる生死判定試験を行った。その結果、生育停止中に死菌と生菌とは異なる膜透過性を有する細胞集団が観察された。また O_2 添加後に気相ガスを嫌気置換したところ一定時間後に生育が回復した。現在、生育停止中の菌体が保持する代謝活性についてメタボローム解析による網羅的な解析を行っており、生育の停止と回復に相関を示す代謝産物に関する知見を報告する。

- The mechanism of obligate anaerobes cannot thrive under O_2 has not been understood yet.
- *Clostridium acetobutylicum*, consumed a few amounts of O_2, leading to growth that is almost equal to the rate of anaerobic conditions.
- *C. acetobutylicum* maintains its viability under O_2.
- We analyzed metabolic profiles of *C.acetobutylicum* under O_2.

1) Kawasaki et al. *AEM* 75, 1021-29 (2009)

Clostridium acetobutylicum, Oxidative stress, Metabolome analysis

発表責任者：宇津智晴（44219007@nodai.ac.jp）

講演番号：2B02-11
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 09:30～ ミーティングルーム B

糸状菌 *Aspergillus oryzae* の *CHO2*/*PEM1* オルソログの機能解析と菌糸生長への影響
Functional analysis of *CHO2*/*PEM1* ortholog of the filamentous fungus *Aspergillus oryzae* and their effects on filamentous growth
○須澤 徹生[1]、岩間 亮[1,2]、福田 良一[1,2]、堀内 裕之[1,2] ([1]東大農、[2]東大　微生物連携機構)
○Tetsuki SUZAWA[1], Ryo IWAMA[1,2], Ryouichi FUKUDA[1,2], Hiroyuki HORIUCHI[1,2] ([1]The Univ. of Tokyo, [2]CRIIM, UTokyo)

リン脂質はオルガネラ等を構成する生体膜の主要成分であり、多様な種類が存在する。出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* において、リン脂質合成経路に関する研究が精力的に行われており、それぞれのリン脂質が特有のオルガネラ膜上で合成されることが知られている。我々の研究室では、糸状菌 *Aspergillus nidulans* におけるリン脂質合成経路に関する研究を行ってきており、*S. cerevisiae* と *A. nidulans* ではリン脂質合成の制御が異なること、*A. nidulans* の細胞形態においてリン脂質の完全性が重要であることが示唆されてきた。

本研究では、顕著なタンパク質分泌能などを有し産業上有用な糸状菌である *Aspergillus oryzae* に着目し、様々なリン脂質生合成遺伝子の発現を制御できる株群を構築することにより、形態形成への影響とタンパク質分泌能へのリン脂質の影響を解析した。*A. oryzae* において、ホスファチジルエタノールアミン (PE)からホスファチジルコリンへの変換に関わる遺伝子 *CHO2/PEM1* のオルソログの発現を抑制したところ、野生型株に比べ PE 量が増加していることが示された。この抑制条件においては、顕著な生育阻害が見られることも示された。また、このオルソログを高発現させると分生子形成器官の形態が異常になった。本発表では、さらにタンパク質分泌能への影響も含めて、リン脂質生合成遺伝子を発現制御することで変化する *A. oryzae* の特性について報告する。

Phospholipids are major components of biological membranes which constitute organelles. In the budding yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, each phospholipid is synthesized on distinctive organelle membranes. We have focused on phospholipid synthesis regulation in the filamentous fugus *Aspergillus nidulans*. Our results suggested that regulation of phospholipid synthesis is different between *Aspergillus nidulans* and *S. cerevisiae*, and that phospholipid's integrity is important in cellular morphology of *A. nidulans*.

Here, we focused on the industrially useful fungus *Aspergillus oryzae*. When the ortholog of *CHO2*/*PEM1*, which is involved in the conversion of phosphatidylethanolamine (PE) to phosphatidylcholine, was suppressed, severe growth retardation was observed. On the other hand, when overexpressed, conidial head with abnormal morphology was appeared. In this presentation, we will report on the influence by altering expression of phospholipid biosynthetic genes to the characteristics of *A. oryzae*, such as cellular morphology and protein secretion.

Aspergillus oryzae, Phospholipid, Cellular morphology

講演番号：2B02-12
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 09:30～ ミーティングルーム B

糸状菌 *Aspergillus nidulans* における Sec14 ファミリータンパク質の生理的機能の解析

Analysis of the physiological functions of Sec14- family proteins in the filamentous fungi *Aspergillus nidulans*

○楊 淳児[1]、須澤 徹生[1]、岩間 亮[1,2]、福田 良一[1,2]、堀内 裕之[1,2]([1]東大農、[2]東大　微生物連携機構)
○ Chuner YANG[1], Tetsuki SUZAWA[1], Ryo IWAMA[1,2], Ryouichi FUKUDA[1,2], Hiroyuki HORIUCHI[1,2] ([1]The Univ. of Tokyo, [2]CRIIM, UTokyo)

リン脂質は生体膜の主要構成成分であり、特にその頭部の構造により、ホスファチジン酸 (PA)、ホスファチジルセリン (PS)、ホスファチジルエタノールアミン (PE)、ホスファチジルコリン (PC)、ホスファチジルイノシトール (PI)などに分類される。これらのリン脂質の合成酵素はそれぞれ特有なオルガネラに局在しており、各々の生体膜間でリン脂質が輸送されることは不可欠である。生体膜間リン脂質輸送において、小胞輸送に依存しないリン脂質輸送が知られており、それに関わるタンパク質は脂質輸送タンパク質 (LTP)と呼ばれる。LTP の一種である Sec14 は、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* において、PI や PC を輸送するタンパク質として知られる。*S. cerevisiae* には、5 つの Sec14 ホモログである Sfh (Sec-fourteen homolog)タンパク質群が存在するが、Sfh タンパク質の欠損は *S. cerevisiae* の生育に大きな影響を与えないことが知られていた。一方で、*n*-アルカン資化性酵母 *Yarrowia lipolytica* においては、Sfh2 オルソログが *n*-アルカン資化に必要なことが示されるなど、*S. cerevisiae* 以外の生物種において、Sfh タンパク質群の機能の重要性が示唆されている（1)。

今回、我々は糸状菌 *Aspergillus nidulans* における Sfh タンパク質群の役割に着目し、ScSec14/ScSfh1 と類似性の高い SfhA、および、ScSfh3/ScSfh4 と類似性の高い SfhE の欠損株を作製した。Δ*sfhA* 株では顕著な生育の悪化が観察されるとともに、Δ*sfhE* 株では、固体最少培地では野生型株と比較して顕著な生育の差は見られなかったが、液体最少培地では顕著な生育の悪化を示した。これらの結果から、*A. nidulans* においても Sfh タンパク質が生育に重要な機能を持つことが示唆された。今回、*sfhA* と *sfhE* を含め、*A. nidulans* におけるその他の Sec14 ファミリータンパク質の機能解析について報告する。

Sec14 is a protein known to transport phospholipids. *S. cerevisiae* has five Sec14 homologs (Sfh1-5, Sec-fourteen homolog 1-5); the loss of Sfh proteins does not significantly affect the growth of *S. cerevisiae*. In contrast, in the *n*-alkane-utilizing yeast *Yarrowia lipolytica*, Sfh2 ortholog was shown to be required for *n*-alkane-utilization, suggesting the functional importance of Sfh family proteins in other species (1). Here, we focused on the functions of Sfh proteins in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. A marked growth retardation was observed in the deletion mutant of *sfhA* or *sfhE*, which is ortholog of *SEC14*/*SFH1*, or *SFH3*/*SFH4*, respectively. We will also report the functional analysis of other Sec14 family proteins in *A. nidulans*.

1. 渡邉ら、日本農芸化学会 2018 年度大会 講演番号 2A03a08

Aspergillus nidulans, Phospholipid, Sec14

講演番号：2B02-13
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 09:30～ ミーティングルーム B

セルラーゼ高生産糸状菌 *Trichoderma reesei* の形態観察にむけた菌糸伸長制御マイクロ流体デバイスの開発

Development of the microfluidic device for morphological observation of cellulase high-producing filamentous fungus *Trichoderma reesei*

○井谷 綾花[1]、北原 雪菜[1]、志田 洋介[1]、大倉 玲子[2]、若本 祐一[2]、小笠原 渉[1]([1]長岡技科大・工、[2]東大院・総合)
○Ayaka ITANI[1], Yukina KITAHARA[1], Yousuke SHIDA[1], Reiko OKURA[2], Yuich WAKAMOTO[2], Wataru OGASAWARA[1] ([1]Nagaoka Univ. Tech., [2]The Univ. of Tokyo, Art and Science)

糸状菌 *Trichoderma reesei* は微生物で最大の酵素分泌量を誇る微生物として古くから研究されている．これまでの研究から，培養条件によって形態が変化することが指摘されていたが，広範にわたる分岐や菌糸のペレット化，さらには形態と酵素生産の両方に影響を与える要因（粘度，攪拌，通気，DO など）により，形態と生成物との関係を調査することは困難であった．本研究では，*T.reesei* の菌糸形態と酵素生産との相関性を明らかにするため，菌糸伸長をリアルタイムに観察する新しいアプローチとして単一菌糸を観察可能な「胞子トラップ型デバイス」および自然な分岐の様子を観察可能な「部屋型デバイス」の 2 種類の PDMS マイクロ流体デバイスを作製した．「胞子トラップ型デバイス」は，胞子トラップ用の狭窄構造を備えることで観察流路へ伸びる単一な菌糸の観察を可能とした．「部屋型デバイス」では観察流路の高さおよび流れを制限することで胞子を捕捉し，分岐の様子を観察することが可能であった．さらに，核ヒストンタンパク質 H2B と緑色蛍光タンパク質（Green fluorescent protein，GFP）の融合タンパク質（H2B-GFP）発現株を開発したマイクロ流体デバイス内で培養することにより，核や液胞などの動態を観察することが可能となった．今後は，開発したマイクロ流体デバイスを用いて酵素生産性に関連する菌糸形態の更なる調査を行う．

The filamentous fungus *Trichoderma reesei* has been studied for a long time as a microorganism that be able to secret a plenty of enzyme. To date, morphological changes of hyphae have been reported. However, extensive branching and forming of pellet of mycelium, as well as factors affecting both morphology and enzyme production (viscosity, agitation, aeration, DO, etc.), the detailed investigation of the relationship between morphology and enzyme production difficult.

In this study, in order to clarify the correlation between hyphal morphology and enzyme production in *T. reesei*, we fabricated two PDMS microfluidic devices, a "spore trap type device" for observing single mycelia and a "room type device" for observing hyphal branching, as a new approach to observe mycelial elongation in real-time. The former was equipped with a narrowing structure for spore trapping, which made it possible to observe a single mycelium extending into the observation channel. The latter allowed us to capture spores and observe their branching by restricting the height and flow of the observation channel. In the future, we will carry out further investigation of the hyphal morphology related to enzyme productivity using the developed microfluidic device.

filamentous fungus, morphology, microfluidic devices

発表責任者：小笠原 渉（owataru@vos.nagaokaut.ac.jp）

講演番号：2B02-14
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 09:30～ ミーティングルーム B

麹菌における核増加の分子機構

Molecular Mechanism of Nuclear Increase in Koji Mold

○細田 柊志[1]、安井 瑞稀[1]、門岡 千尋[1]、高谷 直樹[1]、織田 健[2]、竹下 典男[1] ([1]筑波大、[2]酒総研)
○Shuji Hosoda[1], Mizuki Yasui[1], Chihiro Kadooka[1], Naoki Takaya[1], Ken Oda[2], Norio Takeshita[1] ([1]Tsukuba Univ., [2]NRIB)

米麹における麹菌の破精込みは、蒸米の糖化に関わり、清酒造りの品質に大きく影響する。破精込みは麹菌（種)、米（品種・精米歩合)、水分、湿度、温度などで変化する為に制御が難しく、杜氏の経験や勘に頼るところが大きい。そこで、蛍光イメージングにより *Aspergillus oryzae* の破精込みを定量的に解析した。精米歩合 50%または 90%の酒米（山田錦）または食用米（千代錦）に、GFP で核を標識した *A. oryzae* を生育させて製麹し解析した。その結果、精米歩合 90%と比較して 50%の酒米でより菌糸が米粒中心に破精込んでいる様子が観察された。その研究過程で、培養時間の経過に伴って *A. oryzae* の核が急激に増える現象を発見した。培養 1 日目では菌糸先端細胞に 5~20 の核が等間隔に並ぶが、培養 3 日目には 200 以上の核が菌糸先端細胞に見られた。また、核の増加に伴ってアミラーゼ酵素活性が増加し、核増加と酵素分泌量に相関が示された。このような核の増加は、近縁種の *Aspergillus flavus* では見られないことから、*A. oryzae* が育種選抜の中で獲得した形質である可能性がある。今後、他の *Aspergillus* 属種や *A. oryzae* の様々な株のゲノム比較を行い、核の増加に関わる原因遺伝子の探索を行う。

‘Haze-komi’ of the koji mold in rice koji is related to the saccharification of steamed rice, which greatly affects the quality of sake production. It is difficult to control ’Haze-komi’ in process because it is affected by factors such as koji mold (species), rice (variety and polishing ratio), moisture, humidity, and temperature, and it is highly dependent on the experience and intuition of a master brewer. Therefore, we quantitatively analyzed the breaking-in of *Aspergillus oryzae* by fluorescence imaging. Sake-rice (Yamada-nishiki) or edible rice (Chiyonishiki), milled at 50% or 90%, were used to grow *A. oryzae*, labeled with a GFP nucleus, for analysis. The results show that the mycelium is more concentrated in the grains of 50% of the rice, compared to 90% polished. In the course of the study, we discovered that the nucleus of *A. oryzae* increased rapidly with the passage of time. On the first day of incubation, 5-20 nuclei were evenly spaced on the mycelial tip cells, but on the third day of incubation, more than 200 nuclei were found on the mycelial tip cells. As the number of nuclei increased, amylase enzyme activity increased, indicating a correlation between the number of nuclei and the amount of enzyme secretion. Such an increase in nuclei was not observed in the closely related *Aspergillus flavus*, suggesting that *A. oryzae* may be a trait acquired during breeding and selection. Future work will include genome comparisons of other Aspergillus species and various strains of *A. oryzae* to search for the genes responsible for the increased nuclei.

Koji Mold, Haze-koi, Nuclei

発表責任者：竹下典男（takeshita.norio.gf@u.tsukuba.ac.jp）

講演番号：2B04-01
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 10:30～ ミーティングルーム B

しょうゆ麹菌を用いたエルゴチオネインの高発酵生産

Highly fermented production of ergothioneine using *Aspergillus oryzae*

○佐竹 遼子、市川 惠一、原 精一、伊藤 考太郎（キッコーマン株式会社）
○Ryoko SATAKE, Keiichi ICHIKAWA, Seiichi HARA, Kotaro ITO (Kikkoman Corporation)

エルゴチオネイン（以下、ERG と表記）は 100 年以上前に発見された親水性含硫アミノ酸である。ERG は、高い抗酸化活性をもつことで知られているが、近年、脳の記憶学習能力の改善、うつ病や認知症に対する機能改善等、その生理機能も注目されている。ERG は、キノコなどの菌類や一部の細菌のみが合成できる成分で、ヒトは ERG を生合成できず食事より摂取している。これまではキノコ抽出 ERG が主に使用されてきたが、新たな供給源として、安定供給が可能な微生物による発酵生産が注目されている。我々は、これまでしょうゆ醸造で研究を積み重ねてきた麹菌 *Aspergillus sojae* および *A. oryzae* を用いて、ERG の発酵生産に取組んできた。弊社の麹菌ライブラリーから ERG 高生産株を選抜し、さらに、培養方法を改良した研究成果を発表する。

Ergothioneine (ERG) is a hydrophilic sulfur-containing amino acid discovered over 100 years ago. ERG is known to have high antioxidant activity, but in recent years, its physiological functions such as improvement of memory learning ability of the brain and improvement of function for depression and dementia have been attracting attention. ERG biosynthesis only occurs in specific bacterial and fungal species. Humans cannot biosynthesize ERG and acquire it in the diet. Until now, ERG extracted from mushrooms has been mainly used, but as a new source of supply, fermentation production by microorganisms capable of stable supply is drawing attention. We have been working on the fermentative production of ERG using *Aspergillus sojae* and *A. oryzae*, which have been studied in soy sauce brewing. ERG high-producing strains were selected from our strain library, and the culture methods were improved.

ergothioneine, *Aspergillus*, fermentation

発表責任者：佐竹遼子（rsatake@mail.kikkoman.co.jp）

講演番号：2B04-02
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 10:30～ ミーティングルーム B

麹菌による異種天然物生産における分化制御因子の改変の効果
Effects of development modification on heterologous production of natural product in *Aspergillus oryzae*

○原中 実穂[1]、齋藤 直也[1]、片山 琢也[1,2]、南 篤志[3]、及川 英秋[3]、丸山 潤一[1,2]([1]東大院・農生科・応生工、[2]東大・微生物連携機構、[3]北大院・理)
○ Miho HARANAKA[1], Naoya SAITO[1], Takuya KATAYAMA[1,2], Atsushi MINAMI[3], Hideaki OIKAWA[3], Jun-ichi MARUYAMA[1,2] ([1]Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo, [2]CRIIM, UTokyo, [3]Grad. Sch. Sci., Hokkaido Univ.)

糸状菌の一種である麹菌 *Aspergillus oryzae* は近年、異種天然物生産の宿主として用いられており、その生産性向上は産業利用において重要である。糸状菌は分化によって多様な形態をとるが、*A. oryzae* は無性胞子である分生子と、気中菌糸が密集してできる耐久性の休眠構造である菌核の 2 種類の分化の様式を有している。糸状菌の分化の制御は二次代謝をはじめとする代謝に影響することが知られている。このことから、分化の調節により物質生産を誘導する代謝改変ができれば、宿主の二次代謝と基質を共有する異種天然物の生産効率化の可能性があると考えられる。本研究では *A. oryzae* の有する分化形態のうち菌核に着目し、菌核形成を制御する因子の遺伝子改変による異種天然物生産への効果を解析した。

異種天然物生産のモデルとして、担子菌由来の抗菌活性をもつジテルペン pleuromutilin を利用した。これまでに我々は、*A. oryzae* において菌核形成能に影響を及ぼす転写因子を数多く同定している[1)]。そのなかから遺伝子破壊により菌核数が大幅に増加または減少した転写因子に着目し、pleuromutilin 異種生産株に対して遺伝子破壊を行い生産量の変化を調べた。その結果、菌核形成を抑制すると考えられる転写因子の遺伝子破壊株において pleuromutilin 生産量が増加する傾向が見られた。現在、生産量が増加した株において他の代謝産物を調べることで、遺伝子破壊による生産宿主の代謝変化について解析している。

1) 中村ら、第 67 回日本生物工学会大会要旨集 p.89 (2015)

The filamentous fungus *Aspergillus oryzae* is used as a heterologous production host for natural products. *A. oryzae* possesses two types of development; conidia and sclerotia, which are asexual spores and massive dormant structures, respectively. It is known that fungal development regulation coordinates the metabolic switch related to secondary metabolism. To examine whether modulating fungal development can improve the productivity of heterologous natural products, in this study, we genetically modified the transcription factors that control sclerotia formation. As a model for heterologous natural products, an antibiotic diterpene pleuromutilin was used. We focused on transcription factors, of which gene deletions significantly increased/decreased sclerotia formation. Pleuromutilin production was increased by deleting a transcription factor that probably has an inhibitory function on sclerotia formation. We are presently analyzing the effects of the gene deletion on the metabolism.

Aspergillus oryzae, development, secondary metabolism

発表責任者：丸山 潤一（amarujun@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2B04-03
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 10:30～ ミーティングルーム B

麹菌におけるゲノム編集を利用した代謝遺伝子多重導入による異種天然物生産性の向上

Enhanced production of heterologous natural products in *Aspergillus oryzae* by genome editing-mediated multigene integration for metabolic engineering

○齋藤 直也[1]、片山 琢也[1,2]、南 篤志[3]、及川 英秋[3]、丸山 潤一[1,2]（[1]東大院・農生科・応生工、[2]東大・微生物連携機構、[3]北大院・理）
○ Naoya SAITOH[1], Takuya KATAYAMA[1,2], Atsushi MINAMI[3], Hideaki OIKAWA[3], Jun-ichi MARUYAMA[1,2] ([1]Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo, [2]CRIIM, UTokyo, [3]Grad. Sch. Sci., Hokkaido Univ.)

麹菌 *Aspergillus oryzae* は、近年異種天然物生産の宿主として利用されている。産業利用に向けた高い生産性を実現するためには、異種経路へつながる代謝を増強させる多重の遺伝子改変が不可欠である。我々は *A. oryzae* におけるゲノム編集 CRISPR/Cas9 を利用した高効率の多重遺伝子改変技術を確立したことで [1)]、大規模な代謝改変を試みることが可能になった。そして、担子菌由来のジテルペン pleuromutilin を異種天然物のモデルとして用い、4 重代謝遺伝子改変により 4.8 倍の生産量増加に成功した [2)]。本研究では、基質供給に関わる一連の代謝経路の増強による *A. oryzae* における異種天然物の生産性向上を目的とした。

複数遺伝子の過剰発現による代謝増強を行うため、過剰発現カセットを連続的かつ効率的に導入する手法を新たに開発した。具体的には、遺伝子導入の際に色素合成遺伝子 *wA* の破壊と相補をコロニーの色の変化を指標に繰り返すことで、同遺伝子座に過剰発現カセットを無限に導入し続けることを可能にした。これを利用し、4 重代謝改変株の *wA* 遺伝子座に pleuromutilin 生合成遺伝子を導入したのち、基質供給に関わるメバロン酸経路の遺伝子 *erg10, erg13* の過剰発現カセットを導入した。取得した 6 重代謝改変株の生産量は代謝改変を行っていない株と比較して 6.2 倍に増加した。現在、さらなる代謝関連遺伝子を導入して生産量の解析を行っている。

1) Katayama *et al.* (2019) *Appl. Environ. Microbiol.* 85:e01896-18.
2) 齋藤ら、日本農芸化学会 2020 年度大会講演要旨集 3A07a08

Aspergillus oryzae is used as a host for heterologous production of natural products. For improving the productivity, multiple gene modification enhancing metabolic flux toward heterologous pathway is needed. We previously developed an efficient multigene modification technique by genome editing CRISPR/Cas9 in *A. oryzae*, and then succeeded in improved production of antibacterial diterpene pleuromutilin by quadruple metabolic gene engineering. In this study, to further enhance the production of heterologous natural products in *A. oryzae*, we developed a new system that enables sequential knock-in of multigene overexpression cassettes into *wA* gene locus required for pigment synthesis. Mevalonate pathway genes were knocked-in into the quadruple gene engineered strain to strengthen the substrate supply, and pleuromutilin production was increased by 6.2-fold in sextuple metabolic gene engineering when compared to the unmodified parent strain.

Aspergillus oryzae, genome editing, secondary metabolism

発表責任者：丸山 潤一（amarujun@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2B04-04
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 10:30～ ミーティングルーム B

黄麹菌 *Aspergillus oryzae* におけるコウジ酸生合成遺伝子 *kojA* のプロモーターを使用したポリケチドの長期間生産

Long-term polyketide production by the promoter of *kojA*, a kojic acid biosynthesis gene, in *Aspergillus oryzae*

○玉野 孝一[1,2]、國永 万保子[1]、小島 直[3]、梅村 舞子[1]、町田 雅之[1]、小池 英明[1] ([1]産総研生物プロセス、[2]産総研 CBBD-OIL、[3]産総研健康医工学)
○Koichi Tamano[1,2], Mahoko Kuninaga[1], Naoshi Kojima[3], Myco Umemura[1], Masayuki Machida[1], Hideaki Koike[1] ([1]AIST BPRI, [2]AIST CBBD-OIL, [3]AIST HMRI)

黄麹菌 *Aspergillus oryzae* は、コウジ酸以外の二次代謝産物をほとんど生産しないことが知られている。したがって、有用な二次代謝産物を遺伝子組換えにより異種生産させる場合に、他の糸状菌よりも生産後の精製が容易であると考えられる。そのためクリーンな生産宿主として利用が期待される。特にコウジ酸を非生産にした変異株は、バックグラウンドの二次代謝産物の生産が事実上無くなることから、野生株よりもさらに二次代謝産物の生産に適するものと考えられる。

二次代謝産物には医薬品などに利用されている有用なものが多数存在している。そこでこれまでも黄麹菌による二次代謝産物生産の研究が行われてきたが、それには一次代謝に関連した構成的で非常に強いプロモーターが利用されている。しかし二次代謝産物は一般的に、菌体増殖が定常期に到達し、一次代謝が落ち着いて二次代謝が活性化してから、培地に残存している栄養源を用いて合成される。そこで今回我々は、黄麹菌のコウジ酸生合成に関わる酵素遺伝子 *kojA* のプロモーターを、他の二次代謝産物であるポリケチド YWA1 の生産に使用した。また、宿主の黄麹菌には、従来使われている野生株よりもクリーンな宿主として、コウジ酸非生産の *kojA* 破壊株を使用した。その結果、*kojA* プロモーターは培養開始から 10 日目までの長期間にわたって、ポリケチド YWA1 の連続的な生産を可能とすることを見出した。コウジ酸は分子内に窒素原子を有しておらず、窒素源が少ない培養条件でのみ合成される発現制御を受けている。したがって、今回は *kojA* プロモーターを働かせるため、窒素源が少ないコウジ酸生産培地をポリケチド生産に用いた。ポリケチドも分子内に窒素を含まない。以上の実験結果から、本研究では、ポリケチドやその他窒素非含有の代謝産物を黄麹菌で生産させる場合、*kojA*破壊株と *kojA*プロモーターの使用はその長期間の生産に有意義であることを示すことができた。

Aspergillus oryzae kojA disruptant that does not produce kojic acid was utilized as a host strain for production of a secondary metabolite. Using this host strain, a mutant that expressed a polyketide synthase gene involved in polyketide secondary metabolite production under the *kojA* gene promoter was constructed. Then, polyketide production and polyketide synthase gene expression of the mutant were observed every 24 hours in liquid culture. From days 0 to 10, the polyketide continued to be produced, and the synthase gene expression was maintained. Thus, the *kojA* promoter was activated, and it enabled the continuous production of polyketide for 10 days.

Aspergillus oryzae, *kojA* promoter, long-term metabolite production

発表責任者：玉野 孝一（tamano-k@aist.go.jp）

講演番号：2B04-05
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 10:30～ ミーティングルーム B

製麹過程における黒麹菌による 1-octen-3-ol 生産プロファイルと脂肪酸オキシゲナーゼ *ppo* 発現動態の関連性

Relationship between the production profile of 1-octen-3-ol and the expression patterns of fatty acid oxygenase *ppo* during koji making by *Aspergillus luchuensis*

○片岡 涼輔[1]、渡邉 泰祐[1,2]、山田 修[3]、荻原 淳[1,2]（[1]日大院生資科・生資利用、[2]日大生資科・生命化、[3]酒総研）
○Ryousuke KATAOKA[1], Taisuke WATANABE[1,2], Osamu YAMADA[3], Jun OGIHARA[1,2] ([1]Dept. Biores. Util. Sci., Grad. Sch. Biores. Sci., Nihon Univ., [2]Dept. Chem. Life. Sci., Nihon Univ., [3]NRIB)

【背景・目的】泡盛の特徴的な香気成分である 1-octen-3-ol は，黒麹菌 *Aspergillus luchuensis* によって生産される。その生合成には黒麹菌が有する 3 種の脂肪酸オキシゲナーゼ *ppoA*，*C*，*D* が関与し，そのうち *ppoC* は 1-octen-3-ol 生合成の必須因子であること，*ppoA* および *ppoD* は生産を負に制御することを報告した。しかし、1-octen-3-ol 生合成機構におけるこれら遺伝子の詳細な役割は未だ明らかではない。今回は，製麹過程における黒麹菌の 1-octen-3-ol 生産性の経時変化と各 *ppo* 遺伝子の発現動態を比較することにより，1-octen-3-ol 生合成における各 *ppo* 遺伝子の役割について考察した。また，*ppo* 発現において関与が推測される転写因子の発現動態とその関連性について考察した。
【方法・結果】*A. luchuensis* NBRC4314 を用いた製麹は，温度と湿度の制御下で実施し，19，27，48，72，96 時間の各培養時間で調製した。麹の 1-octen-3-ol 含有量は，ジクロロメタン抽出後に GC-MS に供することにより定量した。1-octen-3-ol 生産性は培養 19 時間で最大を示し，それ以降は減少した。各培養時間における *ppoA*，*C*，*D* の発現動態はそれぞれ異なっていたが、*ppoC* の発現動態は 1-octen-3-ol 生産量の経時変化に類似した傾向を示した。*ppo* に関連する転写因子の発現動態は 2 種類に大別され、各 *ppo* 遺伝子の発現を制御する転写因子が存在する可能性が示された。

1-Octen-3-ol is a major aroma component of awamori which is produced by *Aspergillus luchuensis*. It was reported that three types of fatty acid oxygenases *ppoA*, *C*, and *D* possessed by *A. luchuensis* are involved in 1-octen-3-ol biosynthesis, of which *ppoC* is an essential factor in 1-octen-3-ol biosynthesis. However, the detailed role of these genes in the 1-octen-3-ol biosynthesis is still unclear. In this study, we considered the role of each *ppo* gene by comparing the time course of 1-octen-3-ol productivity and the expression change of each *ppo* gene in the process of koji making.

1-Octen-3-ol productivity was maximized after 19 hours of culture and decreased thereafter. Gene expression levels of *ppoA*, *C*, and *D* in koji at each incubation time showed different expression patterns, with *ppoC* expression showing a similar trend to 1-octen-3-ol productivity. The expression of *ppo* genes-related transcription factors can be classified into two types, suggesting that there are transcription factors that control the expression of each *ppo*.

Aspergillus luchuensis, 1-Octen-3-ol, fatty acid oxygenase

発表責任者：渡邉泰祐（watanabe.taisuke@nihon-u.ac.jp）

講演番号：2B04-06
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 10:30～ ミーティングルーム B

海洋単利株 FT01 の金属腐食性バイオフィルム形成による鉄飢餓応答

Iron starvation response by metal corrosive biofilm in marine isolated bacterium FT01

○伊藤 菜々子[1]、尾花 望[2,3]、渡辺 宏紀[1]、稲葉 知大[4]、宮野 泰征[5]、野村 暢彦[3,6]([1]筑波大院・生命環境、[2]筑波大・医学医療系・TMRC、[3]筑波大・MiCS、[4]産総研・環境管理、[5]秋田大院・理工、[6]筑波大・生命環境系)
○Nanako ITO[1], Nozomu OBANA[2,3], Hiroki WATANABE[1], Tomohiro INABA[4], Yasuyuki MIYANO[5], Nobuhiko NOMURA[3,6] ([1]Grad.Sch.Life Environ.Scy.,Univ.Tsukuba, [2]TMRC,Fac.Medicine,Univ.Tsukuba, [3]MiCS,Univ.Tsukuba, [4]EMRI,AIST, [5]Grad.Eng.Sci.,Akita Univ., [6]Fac.Life Environ.Sci.,Univ. Tsukuba)

微生物金属腐食は通常腐食が生じにくいとされる常温・中性環境においても速やかに腐食が進行し、腐食部ではバイオフィルム（BF）が観察される。BF とは細菌と自身が生産した細胞外マトリクス（EPS）によって構成される三次元構造体である。BF を形成した細菌は浮遊状態と異なる生理活性を示すことが知られ、BF 形成が金属腐食の発生に関連することが予想される。

当研究室先行研究において、ステンレス鋼に対して高い BF 形成能を有し、迅速な金属腐食を引き起こす *Marisediminitalea* sp. FT01 株を同定した。本属菌は海洋に広く存在する細菌の一種であるがこれまでに金属腐食に関する報告はない。また、FT01 株の全ゲノム配列を解析したところ、金属腐食に関わる既知の代謝経路を持たず FT01 株は新規金属腐食機構を有すると予想した。

FT01 株は鉄枯渇条件下でのみステンレス鋼に対して立体的な BF を局所的に形成し金属腐食を引き起こす。一方で、鉄十分存在下では平坦な BF を一様に形成し腐食を引き起こさない。また、鉄枯渇条件下での FT01 株の生育にはステンレス鋼が必須であり、BF 形成に伴って生育に必要な鉄イオンをステンレス鋼から溶出させ、獲得していることが示された。さらに、鉄枯渇条件下では EPS である細胞外多糖と細胞外 DNA 生産量が増加していた。細胞外多糖と細胞外 DNA は立体的な BF 形成と金属腐食の誘導に必要であることが明らかとなった。以上のことから FT01 株は生育環境の鉄イオン濃度に応答して EPS 生産と立体的な BF 形成を制御し、金属腐食を誘導することで環境中の鉄枯渇に適応すると考えられる。

Microbiologically influenced corrosion (MIC) is caused by the physiological activity of microorganisms. Due to insufficient information on bacteria involved in the metal deterioration process in the actual environments, MIC is a global problem with societal and economic consequences. Recently, we isolated *Marisediminitalea* sp. FT01 strain by screening for marine bacteria that cause metal corrosion to stainless steels within 24 h. The bacteria family has not been reported as causative agents of MIC, and FT01 is expected to induce metal corrosion by a novel mechanism.

Here we found that iron starvation condition induced FT01 thick biofilm formation on stainless steel surfaces and the metal corrosion under the biofilm. In addition, the corrosion of stainless steel is necessary for the proliferation of FT01 under iron starvation conditions. Our data indicate that biofilm formation on metal surfaces and consequent metal corrosion serves as a survival strategy for marine bacterium under iron starvation conditions.

Biofilm, Microbiologically influenced corrosion, Iron starvation response

講演番号：2B04-07
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 10:30～ ミーティングルーム B

金属腐食性海洋細菌 FT01 株の金属腐食関連遺伝子の探索

Identification of metal corrosion-related genes in corrosive marine bacterium FT01

○宮川 大[1]、尾花 望[3,5]、伊藤 菜々子[2]、宮野 泰征[6]、野村 暢彦[4,5] ([1]筑波大・生命環境、[2]筑波大院・生命環境、[3]筑波大・医学医療系・TMRC、[4]筑波大・生命環境系、[5]筑波大・MiCS、[6]秋田大院・理工)

○DAI MIYAGAWA[1], NOZOMU OBANA[3,5], NANAKO ITO[2], YASUYUKI MIYANO[6], NOBUHIKO NOMURA[4,5] ([1]Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, [2]Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, [3]TMRC, Fac. Medicine, Univ. Tsukuba, [4]Fac. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, [5]MiCS,Univ. Tsukuba, [6]Grad. Eng. Sci., Akita Univ.)

微生物金属腐食（Microbiologically influenced corrosion: MIC）とは微生物の生理活性によって引き起こされ、化学的な金属腐食とは異なり、常温・中性条件下においても速やかに腐食が進行することが知られている。当研究室の先行研究ではステンレス鋼に対して高いバイオフィルム形成能を有し、迅速に金属腐食を誘導する *Marisediminitalea* sp. FT01 株が単離された。FT01 の全ゲノム配列を解析したところ、MIC に関わる既知の代謝経路を持たないことが明らかとなった。以上のことから、FT01 は新規機構によって MIC を引き起こすことが予想された。そこで本研究では、FT01 による MIC の分子機構を明らかにするため MIC 関連遺伝子の探索を行った。

FT01 は鉄枯渇条件下でのみステンレス鋼表面に立体的なバイオフィルムを形成し、鉄イオンの溶出を引き起こす。また、鉄イオン濃度に応答して能動的にバイオフィルムが脱離することが明らかとなった。これらのことから、外界の鉄イオン濃度に対する応答が FT01 のバイオフィルム形成と MIC に関与すると考えられた。そこで、鉄枯渇条件下で発現量が変動する遺伝子群を RNA シーケンス解析によって同定した。鉄枯渇条件下では 12 個および 17 個の遺伝子の発現がそれぞれ 2 倍以上上昇および減少した。上記の遺伝子群には FT01 の MIC 機構に関わる遺伝子が含まれていると予想される。本発表では、RNA-seq の結果とこれら遺伝子の機能解析結果を報告する。

Microbiologically influenced corrosion (MIC) of metal is caused by the metabolic activity of microorganisms. MIC progresses rapidly, even under normal temperature and neutral conditions. In previous studies, we isolated *Marisediminitalea* sp. FT01 as a causative agent of MIC. The whole-genome sequence showed that FT01 has no known metabolic pathway involved in MIC. This suggests that FT01 cause MIC through a novel mechanism.

Iron starvation conditions induce the 3D structural biofilm formation on stainless-steel surfaces and subsequent metal corrosion. Thus, iron concentration is a crucial factor regulating the corrosive activity of FT01. To determine the genes involved in MIC by FT01, we analyzed differential gene expression in response to iron concentration by RNA-seq analysis. We found that the several genes showed higher and lower expression under iron starvation conditions. We suggest that these contain the genes involved in the biofilm formation and MIC by FT01. We report result of RNA-seq and investigating these genes function.

MIC, biofilm, iron starvation

発表責任者：宮川大（s1913522@s.tsukuba.ac.jp）

講演番号：2B04-08
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 10:30～ ミーティングルーム B

Induction of mass production of lipase and polyester by fatty alcohol stress

○Morio ISHIZUKA[1], Haruhi Ito[1], Taku Otsuka[1], Yuki Kanda[1], Aya Saito[1], Mana Horikoshi[1], Kaori Inoue[1], Shu KATSURAGI[1], Moeka SAKUTA[1], Ai NIHEI[1], Genki Akanuma[2], Kazutoshi Ushio[3] ([1]Department of Applied Chemistry, Chuo University, [2]Department of Life Science, Gakushuin University, [3]Department of Applied Chemistry and Biotechnology, Niihama National College)

Stable and highly stereoselective lipases are attracting attention from the viewpoint of elucidation of physiological significance and industrial use.
We have found that higher alcohols such as stearyl alcohol (StOH) act as the most effective lipase super-inducer.
The addition of StOH as a super-inducing agent for the induction of thermostability and stereoselective lipase production by some *Pseudomonas*-like bacteria, compared to the absence of additives, results in an increase in lipase activity hundreds of times or more.
This means that the lipase activity is enhanced several tens of times as much as when grown in olive oil.
In addition, *Ralstonia* sp. NT80 in it is strongly induced by EliA (lipase-induced effector protein) together with lipase, and is secreted in large quantities extracellularly. The purified EliA reduced the surface tension of water and had n-alkane emulsifying activity.
Both lipase activity and lipase gene transcripts in the EliA gene deletion mutant were significantly reduced compared to the wild-type strain, and lipase activity was significantly increased by the complementation experiment of the EliA gene, so that EliA was hyper-induced to lipase by higher alcohol. However, direct binding to StOH could not be confirmed, and the EliA gene is presumed to be under a transcriptional regulation different from that of the lipase gene.
In addition, StOH-induced lipase expression was suggested by a pull-down assay to be under the control of a two-component system (sensor kinase and response regulator). In NT80, not only a significant increase in lipase secretion but also a large amount of polyhydroxyalkanoate (PHA) intracellular accumulation and cell deformation were observed by the addition of StOH. It is also possible to think that this phenomenon causes a great stress on the cells by replacing olive oil, which is a normal substrate / inducer, with a higher alcohol such as StOH, and the cells overreact.
In *In vitro* , direct emulsification of StOH by EliA alone was rarely observed, and lipase secretion and PHA accumulation were significantly reduced in alcohol dehydrogenase (ADH) deficient strains *adh*. Since complementation recovered to the same level as the wild strain, lipase superinduction and mass secretion through uptake of a small amount of lipase superinducer, induction and secretion of EliA protein, emulsification of StOH by EliA and metabolism by ADH. And it is presumed that a large amount of PHA accumulated in cells occurs. It is expected that the range of applications will be expanded by elucidating the detailed molecular mechanism of this phenomenon.

Lipase, Polyester, Fatty alcohol

発表責任者：Morio Ishizuka（ishizuka@chem.chuo-u.ac.jp）

講演番号：2B04-09
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 10:30～ ミーティングルーム B

Bifidobacterium animalis subsp. *lactis* の酸素ストレス耐性に関与する遺伝子の探索
Exploration of genes involved in the oxidative stress tolerance of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*.
○山本 裕司、磯 奏子、熊谷 菜美子、鳥谷部 茉奈、向井 孝夫（北里大獣）
○Yuji YAMAMOTO, KANAKO ISO, NMIKO KUMAGAI, MANA TORIYABE, TAKAO MUKAI (Kitasato Univ)

Bifidobacterium animalis subsp. *lactis* は、動物の消化管に棲息するビフィズス菌の中で酸素に耐性を示す数少ない菌種であり、そのストレス耐性の高さから生菌が必要とされるプロバイオティクスで広く利用されている。しかし、その高い有用性にも関わらずストレス耐性機構に関する知見は非常に限られている。我々は *B. animalis* JCM 10602 株より酸素感受性株を分離し、その性状を解析することで、本菌が持つ酸素耐性メカニズムの解明を試みている。今回は酸素感受性株で変異が認められた遺伝子の中で、酸素耐性に関与している遺伝子を同定したので、報告する。

解析した酸素感受性株 4 株のうち、3 株では共通して細胞壁合成系遺伝子に変異が認められ、40062D 株と 40092F 株で D-alanyl-D-alanine ligase、100135H 株で Penicillin-binding protein の遺伝子に変異が確認された。また、100135H 株では他の細菌でストレス耐性への関与が報告されている *clpP* 遺伝子にも変異が認められた。次に、これら遺伝子の野生型遺伝子を各酸素感受性株に導入し、好気条件下で生育能を評価した。その結果、野生型遺伝子を導入した酸素感受性株では生育能が向上し、各遺伝子の酸素耐性への関与が確認された。細胞壁合成系あるいは *clpP* 遺伝子に変異が認められた酸素感受性株は、酸素以外のストレス(熱、エタノール、リゾチーム、細胞壁合成阻害剤)にも感受性を示した。一方、残りの 1 株である 100172H 株では、細胞壁合成系やストレス耐性に関与が報告されている遺伝子は認められなかったため、アミノ酸の変異が認められた 3 つの遺伝子の野生型遺伝子を導入し、その好気条件下での生育への影響を評価した。その結果、*phoH* 遺伝子を導入した株で有意な生育の向上が確認された。

Bifidobacterium animalis subsp. *lactis* is a few oxygen-tolerant species among animal-gut resident bifidobacteria, and widely used as probiotics due to its high tolerant ability to multiple stress. However, molecular mechanisms of tolerance to multiple stress including oxidative stress in *B. animalis* are mostly unknown. In this study, we identified several genes involved in oxygen tolerance of the bacterium using oxygen-sensitive mutants derived from *B. animalis* JCM 10602.

bifidobacterium, oxidative stress, probiotics

発表責任者：山本　裕司（yyamamot@vmas.kitasato-u.ac.jp）

講演番号：2B04-10
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 10:30～ ミーティングルーム B

Proteus mirabilis のプトレッシンエクスポーターPstSCAB の同定
Identification of the putrescine exporter PstSCAB of *Proteus mirabilis*
○平野 里佳[1,2]、太田 宏一[1]、杉山 友太[1]、紺谷 優季[2]、阪中 幹祥[1]、栗原 新[1,2]（[1]石川県大生資環、[2]近畿大生物理工）
○ Rika HIRANO[1,2], Hirokazu OHTA[1], Yuta SUGIYAMA[1], Yuki KONTANI[2], Mikiyasu SAKANAKA[1], Shin KURIHARA[1,2] ([1]Ishikawa Prefectural Univ., [2]Kindai Univ.)

【背景】尿路感染症の原因菌である *Proteus mirabilis* は細菌細胞同士が協調し、寒天培地上で生育に伴う移動と停止を繰り返すことで同心円状の生育の痕跡を残すスウォーミングと呼ばれる組織的運動を起こし、この際にプトレッシンをコミュニケーション物質として用いる。これまでに *P. mirabilis* のプトレッシン取り込み系として PlaP が同定されているが、プトレッシンを細胞外に放出するエクスポーターは未同定である。本研究では、*P. mirabilis* のプトレッシンエクスポーターの同定を目指した。
【実験方法・結果】EZ-Tn5™ <KAN-2> Tnp Transposome™ Kit を用いて *P. mirabilis* のゲノム上にランダム挿入変異を導入した。得られた挿入変異株の培養上清中に含まれるプトレッシン濃度を我々が開発した簡易比色定量法を用いて測定し、野生株と比較してプトレッシン濃度が低下した株を特定した。この株について変異が導入された領域を二段階半縮重 PCR 法により特定したところ、PstS（リン酸 ABC トランスポーター基質結合タンパク質）をコードする遺伝子であることが明らかとなった。次いで、二重相同組換え法により *pstSCAB* の遺伝子欠失株を作出したところ、プトレッシン放出能の低下・スウォーミング能力の低下が観察された。
【考察】PstSCAB は *P. mirabilis* のプトレッシンエクスポーターであり、その細胞間コミュニケーションに重要な役割を果たしていることが考えられた。
Proteus mirabilis, a pathogen of urinary tract infections, communicates with neighboring cells and repeats the cycles of migration and consolidation, and forms a concentric ring on agar medium. This multicellular migration is termed swarming. Putrescine acts as a cell-to-cell signaling molecule required for swarming. Although PlaP has been identified as a putrescine importer in *P. mirabilis*, no exporter has been identified. Therefore, this study aimed to identify a novel putrescine exporter of *P. mirabilis*. Random chromosomal insertion of a kanamycin resistance transposon in *P. mirabilis* was introduced. The concentration of putrescine in the culture supernatant of the transposon mutants was measured using our developed colorimetric assay. The putrescine concentration of culture supernatant of *pstS* mutant was lower compared to that of the wild-type strain. Next, we generated Δ*pstSCAB* strain and the putrescine export and swarming ability of the Δ*pstSCAB* was reduced compared to those of the wild-type strain.

Proteus mirabilis, putrescine, swarming

発表責任者：栗原新（skurihara@waka.kindai.ac.jp）

講演番号：2B04-11
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 10:30～ ミーティングルーム B

Characterization and genome structure of broad host range phage vB_EkoM5VN infecting Enterobacter and Citrobacter species

○Thanh Nguyen Cong[1,2], Fujino Yasuhiro[1], Tashiro Kosuke[1], Iwamoto Takeo[3], Hiromasa Yasuaki[1], Doi Katsumi[1] ([1]Kyushu Univ., [2]Plant Protection Research Institute, [3]Jikei Univ.)

1. Introduction

Enterobacter kobei M4-VN is gram-negative, facultative anaerobic, oxidase negative, non-motile, and non-pigmented rod-shaped species isolated from field soil in Hanoi, Vietnam. This strain was considered as potential plant pathogens. Phage vB_EkoM5VN has been isolated with the strain M4-VN as an indicator and be considered as candidate of environmental friendly treatment for plant pathogens. Aim of this study is characterization and genomic analysis of the phage as an essentially useful for further application.

2. Experimental

Phage morphology was observed using transmission electron microscope by negative staining of phage particle isolated from single plaque. The phage sensitivity against various bacteria was confirmed by spot tests. To draw the one step growth curve, the mixture of phages and host cells (MOI= 1) were cultivated in recommended medium according type strain, then phage titer was measured as plaque forming unit at every 10 minutes. Thermal, pH and detergent stability was tested using plaque assay. Phage DNA extraction was carried out by standard method with ultracentrifugation, and then the phage DNA was sequenced with Illumina MiSeq sequencer. ORFs were annotated by DDBJ Fast Annotation and Submission Tool (DFAST).

3. Results

Phage vB_EkoM5VN formed small plaque with *E. kobei* M4-VN, *E. cloacae* subsp. *cloacae* JCM1232 and *Citrobacter freundii* NBRC 12681. The efficiency of plating test showed strains M4-VN and NBRC 12681 to be more susceptible than remain. The phage has hexahedral shaped head (115×85nm), a neck, and a contractile sheath (in uncontracted condition, it has 240 nm length and 20 nm width), which are core features to subscribe into *Myoviridae* family. One step growth curve showed latent phase was 30 minutes, burst period was 30 minutes, and 155 phage particles were released from each absorbed cell in average. Phage activity was stable at the temperature from 10℃ to 50℃ and pH from 6 to 8. The phage was stable with Tween 20, sucrose and water at various concentrations, and susceptible with skim milk and SDS. Genome size of vB_EkoM5VN is 178,408 bp with G + C content of 44.9%. BLAST search revealed that vB_EkoM5VN genome has high similarity to *Citrobacter* phages Magaery and Maroon, and *Cronobacter* phage CsaM_leB. 277 ORFs were predicted on it genome. Two putative endolysin genes were identified in the vB_EkoM5VN genome, which showed 100% identity with those of *Cronobacter* phage vB_CsaM_GAP161 and *Enterobacter* phage EBPL, respectively.

Enterobacter, phage, Citrobacter

講演番号：2B04-12
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 10:30～ ミーティングルーム B

Draft genome sequence of Salinispora sp. Strain H7-4, isolated from deep-sea sediments of the Shikoku Basin

○Dana Ulanova[1,2], Yuka Uenaka[1], Masazumi Sakama[1], Tetsuya Sakurai[1,2] ([1]Fac. Agric. Mar. Sci., Kochi Univ., [2]Cent. Adv. Mar. Core Res., Kochi Univ.)

[Introduction]

Obligate marine actinomycetes belonging to *Salinispora* spp. are producers of many bioactive compounds, including a potent anticancer agent salinosporamide. *Salinipora* spp. have been isolated from the shallow tropical, subtropical and temperate marine sediments, seaweed and marine invertebrates, with only a few deep-sea locations of *Salinispora* spp. presence reported. About 10% of *Salinispora* spp. genomes are dedicated to secondary metabolite biosynthetic gene clusters (BGCs), which often show species-specific and strain-specific distribution. This study presents the genome sequencing analysis of a new *Salinispora* sp. strain isolated from the deep-sea sediments of the Shikoku Basin.

[Methods]

A seafloor sediment sample from the seamount in the Shikoku Basin (1712 m water depth, KH-16-6 cruise) and kept at 4°C until processed. Sediment samples were inoculated on acinomycetes isolation agar, AMM, M1 (10x diluted AMM) and Bennet's agar plates and cultivated at 28°C. The 16S rRNA gene from individual actinomycete-like colonies by colony PCR and sequenced. The genomic DNA of *Salinispora* sp. H7-4 strain library preparation and sequencing were performed at the Beijing Genomics Institute (BGI, Hong Kong). Reads quality was assessed by FASTX-Toolkit. The obtained reads were assembled by the Platanus-b assembler version 1.1.0. The genome annotation was generated by the NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAP). BGC prediction was done by antiSMASH version 5.1.2.

[Results & Discussion]

The seawater-dependent *Salinispora*-like colony H7-4 with an orange substrate mycelium was isolated from M1 agar. The 16S rRNA gene sequence analysis revealed that the isolate shared 99.93% identity with the best hit *S. pacifica* strain CNS-055, indicating the strain H7-4 is a new *Salinispora* phylotype (T) in the *S. pacifica* clade. The draft genome of *Salinispora* sp. strain H7-4 has a total length of 5,258,402 bp, distributed in 81 contigs with the largest contig 692,820 bp long, and the GC content was 70.17%. The annotation of *Salinispora* sp. strain H7-4 identified 4847 total genes and predicted a presence of 23 full or partial BGCs. This study adds the new site of the genus *Salinispora* detection and extends the knowledge on biogeography of these marine actinomycetes. These genomic data can be used for comparative genomic analyses, as well as BGC distribution and evolution studies.

[Reference]

Ulanova D. *et al. Microbiology Resource Announcements* 9:45 e00834-20 (2020).

actinomycetes, Salinispora, genome

発表責任者：Dana Ulanova（ulanova@kochi-u.ac.jp）

講演番号:2B04-13
質疑応答日時、会場:3 月 19 日 10:30～ ミーティングルーム B

藻食性魚類から単離した *Vibrio* 属細菌のテリトリー形成

Territory formation of *Vibrio* bacteria isolated from the herbivorous fishes

〇田部 卓磨、秋吉 英雄、吉田 真明、川向 誠（島根大学）
〇Takuma Tanabe, Hideo Akiyoshi, Masa-aki Yoshida, Makoto Kawamukai (Shimane Univ.)

腸内微生物の重要性は、ヒトの腸内細菌の研究を中心に、その分布や乳酸菌の解析などから、健康に対する影響の大きさから注目されている。一方、魚類の腸内細菌の研究が非常に少ないことから、我々は、藻食性魚類の腸内細菌の分布と単離の研究を進めることにした。藻食性魚類は、胃を有せず、腸内でモズクや海藻を消化していることから、特徴的な腸内細菌が存在することを期待して研究を行った。今回は、藻食性魚類として、スズキ目ギンポ亜目イソギンポ科のヨダレカケとホシギンポの2種を選定し、それぞれ2回ずつ計4回の腸内細菌の単離を行った。その結果、合計50を超えるコロニーを単離し、それらの16S rDNAの解析を行った。ヨダレカケとホシギンポでは、互いに異なる属種の腸内細菌が認められたが、共通して*Vibrio*属の細菌が多く認められた。その細菌を単離する過程で、ヨダレカケとホシギンポの両方から遊走性を持つ株が10種類単離された。そのほとんどが*Vibrio alginolyticus*に分類された。これらの菌株を同一プレート上で培養すると、興味深いことに、異なる株同士で、互いに混じり合わないようにテリトリー様の境界を形成することを観察した。このような境界はProteus属で報告されているが、*Vibrio*属での報告はされていなかった。その中の*Vibrio*属の２株について全ゲノム配列を決定し、特徴的な配列の有無を検討している。

The importance of intestinal microorganisms on their human health has been recognized from the study of distribution of intestinal bacteria and effects of lactic acid bacteria. Since few studies on the intestinal bacteria of fishes have been conducted, we decided to study the distribution and isolation of the intestinal bacteria of herbivorous fishes. Since herbivorous fishes do not have a stomach and digest seaweeds in the intestine, we expect that characteristic intestinal bacteria would be present. In this study, two species of Perciformes, Blennies, *Andamia tetradactylus* and *Entomacrodus stellifer* were selected as herbivorous fish, and intestinal bacteria were isolated. As a result, a total of more than 50 colonies were isolated and their 16S rDNAs were analyzed. Intestinal bacteria of different genera were found in two fishes, but many *Vibrio* bacteria were commonly found. In the process of isolating bacteria, 10 migratory strains were isolated from both fishes. Most of them are classified as *V. alginolyticus*. Interestingly, when these strains were cultured on the same plate, different strains formed territory-like boundaries so that they would not mix with each other. Such boundaries have been reported in the genus *Proteus*, but not in the genus *Vibrio*. The entire genome sequences of two such *Vibrio* strains have been determined, and their characteristic sequences are currently investigating.

Vibrio, intestinal bacteria, herbivorous fish

発表責任者:川向 誠（kawamuka@life.shimane-u.ac.jp）

講演番号：2B04-14
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 10:30～ ミーティングルーム B

自家蛍光シグネチャー解析による微生物の生死判別及び死因の推測

Spectrum of cell death: Single-cell innate fluorescence signature reflects the process of cell death

○張 譯云[1]、高部 響介[2]、下段 千尋[1]、野村 暢彦[2,3]、八幡 穣[2,3] ([1]筑波大・生命環境学群、[2]筑波大・生命環境系、[3]筑波大・微生物サステイナビリティ研究センター)
○Yiyun ZHANG[1], Kyosuke TAKABE[2], Chihiro SHIMODAN[1], Nobuhiko NOMURA[2,3], Yutaka YAWATA[2,3] ([1]Sch. of Life and Environ. Sci., Univ. Tsukuba, [2]Fac. of Life and Environ. Sci., Univ. Tsukuba, [3]MiCS, Univ. Tsukuba)

現在、細胞の生死は培養や染色などによって評価されている。一方、これらの破壊的または複雑な処理などを行わずに、非侵襲的に細胞の生死を判定することが困難である。そのため、微生物の生死を、迅速かつ無害に判定する方法が求められている。本研究では、これを解決する方策として、細胞の自家蛍光というものに着目した。自家蛍光は細胞にレーザー光を照射した際に、タンパク質、脂質、核酸などの様々な生体分子から生じる細胞内在性の微弱なシグナルである。そこで、細胞の生死によって異なる自家蛍光の特徴があると考えた。まず大腸菌をモデルとして、様々な殺菌方法の間で一細胞ごとの自家蛍光の総体（「自家蛍光シグネチャー」）を比較した。その結果、死細胞は特徴的な自家蛍光シグネチャーを有し、それに基づいて生細胞との判別ができることがわかった。また、機械学習手法を用いることで、細胞の死因（殺菌方法）を一細胞自家蛍光シグネチャーから予測できた。さらに、各種細菌系統間においても生死や死因によって共通する死細胞の特異的な自家蛍光パターンが存在するかを検討した。本研究の結果からは、微生物の生死を自家蛍光という細胞内在性のシグナルで非破壊的に判別できるだけでなく、さらに細胞の“死因”を迅速に判別できることを示唆しており、新たな微生物の生死判定法への利用が期待される。

A cell’s innate fluorescence signature, an assemblage of autofluorescence signals emitted by a plethora of biomolecules within a cell, is known to serve as useful proxy to probe into a cell’s physiological status. Here we comprehensively analyzed if the innate fluorescence signature can be harnessed to determine if a cell is alive or dead. We used CRIF (confocal reflection microscopy assisted innate fluorescence analysis), a technique we recently developed which allows analyzing innate fluorescence signature at the level of single-cell, to compare the innate fluoresce signatures of live and dead cells. The result showed that the dead cells exhibit distinct innate fluorescence signature, based on which a machine learning models could predict a cells live/dead with a high-level of accuracy. Furthermore, we found a different stimulus leaves characteristic intercurrence signature to the cells, which again allowed highly accurate classification by machine learning models. These results suggest innate fluorescence signature is a reliable marker for a cell’s live/death status. We propose the innate fluoresce analysis is a promising addition to the arsenal of microbiology, which allows fast, simple and tag-free analysis of cell death.

Autofluorescence, non-invasive analysis, confocal microscopy

講演番号：2B04-15
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 10:30～ ミーティングルーム B

シングルセルラマン分光と機械学習を用いた原核生物の非破壊微生物種識別

Nondestructive prokaryotic species discrimination using single-cell Raman spectroscopy and machine learning

○菅野 菜々子[1]、加藤 真悟[2]、松井 求[3]、重藤 真介[1]（[1]関西学院大・院理工、[2]理研 BRC、[3]東大・院理）
○Nanako KANNO[1], Shingo KATO[2], Motomu MATSUI[3], Shinsuke SHIGETO[1] ([1]Kwansei Gakuin Univ., [2]RIKEN-BRC, [3]Grad. Sch. of Sci., Univ. of Tokyo)

次世代シーケンサーを用いた菌叢解析を始めとして、アーキアを含む多種多様な原核生物の環境中における様々な活動がメタオミクス解析により見出されている。これら多様な微生物の中から特定の微生物にアクセスしその機能を解析するためには、微生物細胞の系統分類群や生理活性を非破壊的に，かつ高精度で識別する手段が必要となる。顕微ラマン分光法は細胞の生体分子情報を顕微鏡下で非破壊的に取得することが可能な最先端の顕微分光技術である。本研究では、この非破壊顕微ラマン分光解析と機械学習を用いて、アーキアを含む複数の微生物種の混合試料から 1 細胞レベルで種を識別する方法を提案し、その概念実証実験を行なった。

バクテリアとして *Bacillus subtilis* および *Thermus thermophilus,* アーキアとしてアンモニア酸化アーキア *Nitrososphaera viennensis* を用いた。微生物細胞をリン酸緩衝液に懸濁し、水溶液中の細胞を観察した。細胞のラマンスペクトルは倒立顕微鏡を基礎とした共焦点レーザーラマン顕微鏡（励起波長 632.8 nm）を用いて、レーザー強度 3 mW, 露光時間 30 秒の条件で取得した。微生物種ごとに 30 細胞以上のラマンスペクトルを取得して機械学習モデルの学習データとし、3 種識別モデルを作成した。機械学習アルゴリズムには RandomForest を用いた。テストデータとして上記 3 種混合試料を作成し、微生物種ごとに 20 細胞以上のスペクトルを取得した。混合試料中の微生物種判別には細胞形状を用いた。作成した識別モデルを用いてテストデータの微生物種識別を 1 細胞ごとに行なったところ、全体の正解率 98%の精度で種を識別することができた。

非破壊顕微ラマン分光法と機械学習を用いて、アーキアを含む 3 種の微生物混合試料から 1 細胞レベルで微生物種を高精度に識別することに成功した。今後はさらに種を増やし、汎用性の高い識別モデルを構築するとともに、種の識別に寄与した生体分子種をラマンスペクトルから帰属することで、系統分類群や生理活性物質の識別精度を向上させる。

Single-cell Raman spectra serve as the molecular fingerprints of individual cells, which can link the cells to their phenotypic information. Here, we demonstrate discrimination of microbial species at single-cell level in a mixed population containing two bacterial and one archaeal species using nondestructive Raman microspectroscopy and machine learning. We successfully discriminated among the tested species at the single-cell level with an overall classification accuracy rate of 98%. Nondestructive species discrimination of single microbial cells will be a powerful tool to uncover cells of certain species and/or with specific functions for various single-cell analyses such as single-cell genomics and ecophysiological analysis.

Single-cell analysis, Raman microspectroscopy, Archaea

発表責任者：重藤 真介（shigeto@kwansei.ac.jp）

講演番号：2B07-01
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 13:30～ ミーティングルーム B

伝統的水産系発酵食品”くさや”からの新規海洋性放線菌の分離とその微生物学的特徴

Isolation and bacterial characteristics of new marine-derived actinomycetes from a Japanese traditional aquatic fermented fish product, Kusaya

○竹内 葵[1]、篠田 佳那[1]、喜多 孝介[2]、池浦 祐史[2]、佐藤 拓海[3]、長田 隆弘[4]、荒川 賢治[5]、石川 森夫[1,2]、鈴木 敏弘[1,2] ([1]東農大院・醸造、[2]東農大・醸造、[3]東農大・分微、[4]長田商店、[5]広島大院・統合生命)

○Aoi Takeuchi[1], Kana Shinoda[1], Kohsuke Kita[2], Yuji Ikeura[2], Takumi Sato[3], Takahiro Osada[4], Kenji Arakawa[5], Morio Ishikawa[1,2], Toshihiro Suzuki[1,2] ([1]Dept. Ferment. Sci., Tokyo Univ. of Agric., [2]Ferment. Sci. and Tech Tokyo Univ. of Agric., [3]Dept. Mol. Microbiol., Tokyo Univ. of Agric., [4]Osada Shouten, [5]Integ. Sci. life., Hiroshima Univ)

【目的】 海洋由来の放線菌は塩分を含む海水に存在しており、海洋環境という陸上とは全く異なる環境で生育可能なことから、近年新しい構造・活性を持つ生理活性物質を生産すると報告されている。我々は海洋性・好塩性放線菌の分離源として、水産系発酵食品の一つである「くさや」に着目した。くさやは開放下で、海水成分と塩水が濃縮された高塩濃度のくさや汁に魚を浸漬して製造される塩蔵干物であり、くさや汁中に存在する微生物由来の生理活性物質によって保存性が高いと言われている。本研究では、生理活性物質を生産する海洋性・好塩性放線菌の分離源としてくさや及びくさや汁を用い、分離された放線菌株に対しての生理活性物質生産性の検討と NaCl 濃度が生育に与える影響について調べた。

【方法・結果】 くさや及びくさや汁を分離源として放線菌の獲得を試みた。くさやは摩砕して滅菌水に懸濁したもの、くさや汁は未処理のものをそれぞれ原液とし、それらを希釈して各種放線菌選択分離培地に塗抹後 28℃で約 2 週間培養する事で 4 株の放線菌の分離に成功した。16S rRNA 遺伝子解析により、くさや分離株は *Streptomyces* sp. TUA-NKU25、くさや汁分離株は *Streptomyces* 属 2 種、TUA-HKG01W 及び TUA-HKG03B、希少放線菌 *Amycolatopsis* sp. TUA-HKG02Y と同定した。各放線菌分離株の培養液を酢酸エチルで抽出して濃縮物を得たのち、ペーパーディスク法にてバイオアッセイを行なった結果、全ての分離株がいくつかの検定菌に対して抗菌活性を示した。分離株の中でも特に TUA-NKU25 は、その生育に NaCl を要求し、NaCl 非存在下では生育は見られないが、NaCl 存在下で生育が顕著に増加する特徴を有していた。この事から、水産系発酵食品であるくさやには複数の海洋性・好塩性放線菌が存在し、くさや及びくさや汁中に含まれる生理活性物質の生産に関係している可能性が示唆された。現在、NaCl の有無による培養抽出物中の生理活性物質の違いについて、高速液体クロマトグラフィーを用いて詳細に分析を行っている。

Marine-derived actinomycetes produce new antimicrobial compound compared to terrestrial-derived actinomycetes. We focused on kusaya and kusaya gravy as isolation source, because kusaya is made by soaking kusaya gravy containing concentrated seawater. In this study, we isolated marine-derived actinomycetes from kusaya and kusaya gravy and examined the effect in their growth under the presence of NaCl. We isolated four Actinomycetes, three *Streptomyces* species and *Amycolatopsis* from kusaya and kusaya gravy using various selected media. All isolated strains showed antimicrobial activity against various test strains. In particular, kusaya-derived *Streptomyces* showed good growth under the presence of NaCl, but the absence of NaCl did not. The effect of NaCl on antimicrobial compound production is in progress.

marine actinomycetes, fermented food, kusaya

発表責任者：鈴木 敏弘（ts206188@nodai.ac.jp）

講演番号：2B07-02
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 13:30～ ミーティングルーム B

パッションフルーツ種子からの内生菌の分離
Isolation of endophytes from *Passiflora edulis* seeds
○石田 葵、古屋 俊樹（東京理科大院）
○Aoi ISHIDA, Toshiki FURUYA (Fac. Sci. Tec., Tokyo Univ. Sci.)

【背景・目的】果物として親しまれているパッションフルーツ（*Passiflora edulis*）の種子には、ピセアタンノールやレスベラトロール等のポリフェノールが豊富に含まれている。これらの化合物は、多様な有用生理活性を示すことが近年明らかにされ、注目されている。一方、これらのポリフェノールは微生物に対してはファイトアレキシンとして作用することが知られている。これより、パッションフルーツ種子の内部は微生物が生存しにくい環境にあると予想され、その存在や性質に興味が持たれる。そこで本研究では、パッションフルーツ種子から内生菌の分離を試みた。さらに、取得した微生物の属種を同定し、諸性質を解析した。
【方法・結果】表面殺菌を行ったパッションフルーツ種子を切断し、内部を固体培地に接触させることにより内生菌の分離を試みたが、微生物のコロニーは出現しなかった。一方、無菌条件下で種子を発芽させ、幼芽を切断して固体培地に接触させたところ、興味深いことにコロニーが形成された。この手法により、19 株の細菌を単離することに成功した。取得した種子内生菌について 16S rRNA 遺伝子配列に基づいた属種同定を行なったところ、その多くは放線菌門に属することが明らかとなった。
　種子から直接コロニーを形成できない原因として、種子に多量に含まれるピセアタンノールが生育を阻害している可能性が考えられたため、つぎに、取得した内生菌のピセアタンノールに対する耐性を評価した。その結果、多くの株はピセアタンノール存在下において生育が阻害されるものの、ピセアタンノール処理後の微生物は栄養寒天培地上で生育可能であった。これより、これらの内生菌はピセアタンノールにより静菌作用をもたらされるが殺菌されることはなく、種子内においても生存可能であることが示唆された。
　一方、植物内の環境に適応した内生菌の中には、その環境の化合物に対して変換活性を示す株が存在することが多く報告されている。そこで、取得した細菌のレスベラトロールおよびピセアタンノールに対する資化性と変換活性を評価した。その結果、これまでにレスベラトロールをピセアタンノールに変換する株の存在が明らかとなった。

The seeds of *Passiflora edulis* would be hard to inhabit for microorganisms, because they contain stilbene derivatives as defense agents at high levels. In this study, we succeeded in isolating 19 bacterial endophytes from *P. edulis* seeds, most of which were classified as Gram positive.

endophytes, *Passiflora edulis*, piceatannol

発表責任者：古屋俊樹（tfuruya@rs.tus.ac.jp）

講演番号：2B07-03
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 13:30～ ミーティングルーム B

移動性の高いショウジョウバエからの野生酵母の単離と多様性
Isolation and diversity of wild yeasts from highly mobile Drosophila
○清家 泰介[1,2]、阪田 奈津枝[1]、古澤 力[1,3]([1]理研・生命機能科学、[2]大阪大学・大学院情報科学研究科、[3]東京大学・理学系研究科)
○Taisuke SEIKE[1,2], Natsue Sakata[1], Chikara Furusawa[1,3] ([1]RIKEN, Center for Biosystems Dynamics Research, [2]Osaka Univ, Graduate School of Information Science and Technology, [3]The University of Tokyo, Graduate School of Science)

酵母を用いた有用物質生産においては、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* といったモデル酵母に加えて、新しい機能を持った non-conventional な酵母の利用が近年期待されている。しかし、野生酵母の情報は不足しており、自然界に棲息する酵母のうち、私たちが認識できているものはほんのわずかであると言われている。そのため、野外に棲息する酵母種の中には、有用な酵母が含まれる可能性が極めて高いと考えられる。そこで私たちは、野生酵母の探索にあたり、ショウジョウバエに着目した。ショウジョウバエは酵母を餌とし、移動性が高く、さらに腸管内に摂餌した微生物を蓄えるクロップと呼ばれる袋状の臓器を所有していることから、ハエの体内には多様な酵母が棲息していると考えられる。そこで、実際 2020 年 4 月～10 月の期間、国内の 3 箇所（大阪、東京、沖縄）にバナナトラップを仕掛け、約数千匹のショウジョウバエを採集した。ショウジョウバエから酵母の分離を試み、合計 360 株の酵母を単離した。リボソーム RNA 遺伝子の解析から種を同定することにより、現在までに 27 属 78 種もの酵母の単離に成功し、そのうち報告のない未知の酵母も 5 種発見した。本発表では、単離できた分裂酵母 *Schizosaccharomyces japonicus* の面白い特徴について紹介する。

In addition to model yeasts such as the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*, non-conventional yeasts with new functions are expected to be used in the production of useful substances. However, information on wild yeasts is scarce and we are only aware of a few yeasts in nature. Therefore, it is extremely likely that the yeast species that live in the field contain useful yeast. In this study, we focused on the fruit fly *Drosophila melanogaster* for searching wild yeasts. *Drosophila* feeds on yeast, is highly mobile, and possesses a pouch-like organ called a ‘crop’ that stores the microorganisms. We actually set banana traps at three locations in Japan (Osaka, Tokyo, and Okinawa) from April to October 2020 and collected about several thousand *Drosophila*. We attempted to isolate yeast from *Drosophila* and isolated a total of 360 yeast strains. By identifying species from analysis of ribosomal RNA genes, we have succeeded in isolating 78 species of yeast (27 genus) so far, of which five yeasts have been found that have never been reported. Here, we describe the interesting features of the isolated fission yeast *Schizosaccharomyces japonicus*.

yeast, Drosophila, diversify

発表責任者：清家 泰介（taisuke_seike@ist.osaka-u.ac.jp）

講演番号：2B07-04
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 13:30～ ミーティングルーム B

もみ殻マイココズム培養における *Trichoderma reesei* と土着微生物の協調的なバイオマス分解
Cooperative biomass degradation of *Trichoderma reesei* and indigenous microorganisms in rice husk mycocosm culture system

○岩波 明季[1]、浦山 俊一[1,2]、萩原 大祐[1,2] ([1]筑波大生命環境、[2]筑波大・MiCS)
○Aki IWANAMI[1], Shun-ichi URAYAMA[1,2], Daisuke HAGIWARA[1,2] ([1]Fac. of Life & Env., Univ. of Tsukuba, [2]MiCS., Univ of Tsukuba)

【背景】自然環境における植物バイオマスの分解は、セルラーゼ、ヘミセルラーゼ、およびリグニン分解酵素を生産する真菌類が大きな役割を果たしている。産業上も重要なこれらの酵素の生産調節機構や反応機構の研究は進んでいるが、多様な菌類が共存する自然環境においてほとんど明らかにされていない。本研究では、非滅菌のもみ殻を用いた培養系を確立し、植物バイオマス分解における真菌類の機能発現の分子機構および、土着の微生物群集との相互作用の影響を *T. reesei* を用いて解析した。
【結果】非滅菌および滅菌もみ殻に *T. reesei* を接種し、4 週間後の乾燥重量を比較すると、非滅菌もみ殻において重量がより減少したことから、*T. reesei* と土着の菌による協調的な分解促進が示唆された。しかし、非滅菌もみ殻培養では、接種した *T. reesei* の生育菌体量が 7 日目以降に低く抑えられていることや、総セルラーゼ活性が *T. reesei* 接種の有無で差がないことから、*T. reesei* が主として分解に関わらないことが考えられた。実際、非滅菌もみ殻で生育する *T. reesei* のセルラーゼ関連遺伝子の多くは発現が抑制されることが、RNA-seq 解析により明らかになった。そこで、培養 4、8 週間後におけるもみ殻真菌叢解析を行ったところ、*T. reesei* を接種した場合に *Curvularia* 属菌、*Coprinopsis* 属菌の存在比率が上昇していた。以上から、土着菌が共存する環境では *T. reesei* はバイオマス分解に直接関与せず、周辺微生物の生育を促進する等の影響を与えていることが示唆された。

Plant biomass is primarily degraded by fungi producing cellulase, hemicellulose, and lignin degrading enzymes in natural environment. So far, it is poorly understood how cooperatively microbial community degrades plant biomass. To address the issue, a microcosm culture with *T. reesei* based on non-sterile rice husk was developed. The weight of rice husk was significantly decreased when *T. reesei* was inoculated into non-sterile rice husk. However, total cellulase activity was unchanged by *T. reesei* inoculation. Accordingly, the expression of most of cellulose related genes was suppressed. Mycobiome analysis by ITS amplicon sequencing revealed that *Curvularia* and *Coprinopsis* are present in higher proportion when *T. reesei* was inoculated. These results suggest that *T. reesei* is not directly involved in biomass decomposition in an environment where indigenous microbes coexist, but has a supportive role in promoting the growth of surrounding microorganisms.

Trichoderma reesei, microbiome, cellulase

発表責任者：萩原大祐（hagiwara.daisuke.gb@u.tsukuba.ac.jp）

講演番号：2B07-05
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 13:30～ ミーティングルーム B

土壌環境における糸状菌 *Aspergillus nidulans* の二次代謝の生態的な役割の解析
Evaluation of ecological role of secondary metabolism of *Aspergillus nidulans* in a soil environment
○高田 万里奈[1]、河内 護之[3]、大西 康夫[3,4]、妹尾 啓史[3,4]、清水 公徳[2]、浦山 俊一[1,5]、萩原 大祐[1,5] ([1]筑波大・生命環境、[2]東理大・基礎工、[3]東大院・農生科、[4]東大・CRIIM、[5]筑波大・MiCS)
○ MARINA TAKATA[1], MORIYUKI KAWAUCHI[3], YASUO OHNISHI[3,4], KEISHI SENOO[3,4], KIMINORI SHIMIZU[2], SYUNICHI URAYAMA[1,5], DAISUKE HAGIWARA[1,5] ([1]Life Env. Sci., Tsukuba Univ., [2]Dept. of Biol Sci and Tech., Tokyo Univ. of Science, [3]Grad. Sch. of Agric. and Life Sci, Tokyo Univ., [4]CRIIM, Tokyo Univ., [5]MiCS, Tsukuba Univ.)

微生物は自然環境中では液体培地や寒天培地のような物性的に均一な環境に遭遇することはあり得ず、微生物本来の生理生態を理解するには、より複雑な培養系での評価が必要である。そこで本研究では、実験室で運用可能な閉鎖的土壌培養系を確立し、土壌生態系の主要な構成微生物である糸状菌の土壌における生態の理解を試みた。滅菌及び非滅菌の灰色低地土を用いて、*Aspergillus nidulans* を培養すると、菌体量は培養一日後に最大となるが、胞子形成が進展するにつれて減少した。続いて、土壌培養時の生理状態を理解するために、RNA-seq 解析を行なった。その結果、複数の二次代謝生合成遺伝子クラスターが、寒天培地培養と比較して非滅菌土壌培養において高く発現していることが示された。そこで、二次代謝化合物が土壌微生物との相互作用に関わっている可能性を検証するために、二次代謝マスターレギュレーターLaeA の遺伝子破壊及び高発現株を作製し、土壌培養時の生育と土壌微生物叢の解析を行なった。その結果、いずれの変異株も野性株と同等の生育を示し、土壌微生物群集の構成にも大きな影響を与えないことが明らかになった。したがって、LaeA 依存的な二次代謝の変化は、糸状菌の土壌生育にとって重要な機能を持たないと推測される。現在、二次代謝産物の生態的な機能についてさらなる検証を進めている。

Fungi naturally inhabit in the soil, where nutrition is relatively poor and the physical structure is ununiform, compared with laboratory conditions using culture media. To understand how fungi grow and behave in the soil, we established soil microcosm that can be operated in laboratory, which enables us to understand the ecology of filamentous fungi in the soil environment. *Aspergillus nidulans* was cultivated in sterilized or non-sterilized gray lowland soil. Then, we performed RNA-seq to identify a set of genes that were expressed in soil-specific manner. In non-sterile soil culture, some secondary metabolism biosynthetic gene clusters were coordinately expressed at higher levels compared with agar plate culture. To evaluate the roles of fungal secondary metabolites in the soil, mutant strains defective in or overexpressing *laeA* gene that is a master regulator of fungal secondary metabolism were constructed. Growth of both the mutants in the soil was comparable to that of parental strain, and soil microbiome was not affected by LaeA disruption/overexpression. These results suggested that fungal secondary metabolites play a minor role in prospering in the soil.

Aspergillus nidulans, soil environment, secondary metabolism

発表責任者：萩原大祐（hagiwara.daisuke.gb@u.tsukuba.ac.jp）

講演番号：2B07-06
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 13:30～ ミーティングルーム B

日光文化財に発生する真菌叢の網羅的解析と光触媒による抗真菌試験

Comprehensive analyses of fungal flora occurring on the cultural property of Nikko Toshogu Shrine and photocatalytic antifungal test

○須崎 裕人[1]、小笠原 麻衣[1]、三浦 菜摘[1]、鈴木 孝宗[2]、寺島 千晶[2]、藤嶋 昭[2]、鈴木 智順[1,2]([1]東理大応生、[2]東理大総研)
○ Yuto SUZAKI[1], Mai OGASAWARA[1], Natsumi MIURA[1], Norihiro SUZUKI[2], Chiaki TERASHIMA[2], Akira FUJISHIMA[2], Tomonori SUZUKI[1,2] ([1]Department of Applied Biological Science, Tokyo University of Science, [2]Research Institute for Science & Technology, Tokyo University of Science)

日光東照宮は修理完了直後から彩色部分に真菌によると思われる黒い変色が見られ、その対策が急務となっている。そこで、この問題を解決するために、文化財に発生する真菌の網羅的解析と、防除のための光触媒殺菌試験を行い、文化財保護に貢献することを目的とした。これまでに日光文化財および自然環境から分離された真菌 268 株に対して系統解析を行った。また、第三世代シークエンサーである MinION を用いて非培養法的真菌叢解析も行った。光触媒殺菌の有効性は、TiO_2コーティング彩色木片上で真菌の生育が抑制されることを確認して評価した。さらに、様々な真菌に対する光触媒殺菌効果の評価をコロニー計数法による生存率で行った。

その結果、培養法では空気中や建造物で一般的にみられる真菌種が生育していることが判明した。非培養法では、*Bodoinia* 属や *Neofusicoccum* 属といった真菌属が優位を占めていた。光触媒殺菌試験では、TiO_2彩色木片に UVA を照射することで、真菌は生育能力を失うことが示された。加えて、真菌胞子の色の違いによって光触媒殺菌性能に差が生じることが示唆された。

Black discoloration due to mold growth is occurring in the colored parts of Nikko Toshogu Shrine. Therefore, we aimed to contribute to the protection of cultural properties by conducting comprehensive analyses of the fungi that occur in cultural properties and photocatalytic sterilization tests for controlling the fungi. So far, phylogenetic analysis has been performed on 268 fungal strains isolated from cultural properties and natural environments at Nikko. Besides, we performed non-cultured fungal flora analysis by using MinION, a third-generation sequencer. The effectiveness of photocatalytic sterilization was evaluated by confirming that fungal growth was suppressed on TiO_2-coated colored wood pieces. Furthermore, the photocatalytic fungicidal effect on various fungi was evaluated by the survival rate.

As a result of phylogenetic analysis, isolates from cultural properties were generally observed in the air and buildings. In the non-culture method, fungal genera such as *Baudoinia* and *Neofusicoccum* were dominant. The effectiveness of photocatalytic sterilization was shown to have a sterilizing effect on the colored wood piece coated with TiO_2. Furthermore, it was suggested that the difference in the color of fungal spores causes different photocatalytic fungicidal effects.

photocatalysis, antifungal test, fungal flora analysis

講演番号：2B07-07
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 13:30～ ミーティングルーム B

人工遺伝子回路トグルスイッチの遺伝子発現量制御

Regulation of gene expression level on artificial genetic circuit "Toggle Switch"

○兼廣 健吾[1]、濱田 浩幸[2]、花井 泰三[2] ([1]九大院シス生、[2]九大農)
○Kengo KANEHIRO[1], Hiroyuki HAMADA[2], Taizo HANAI[2] ([1]SLS, Kyushu Univ., [2]Kyushu Univ.)

我々の研究室では、トグルスイッチ（Fig.1A）と呼ばれる人工遺伝子回路を用いて大腸菌の代謝状態を切り替え、回分培養の物質生産性の向上を実現した。その回路内遺伝子の発現量ならびに状態遷移時間の制御は、代謝バランス最適化による物質生産性のさらなる向上を実現する可能性がある。本研究では、「翻訳効率改変による誘導前後の目的遺伝子発現量の制御」と「*tetR* の翻訳効率改変による状態遷移時間の制御」の実現可能性を検討した。

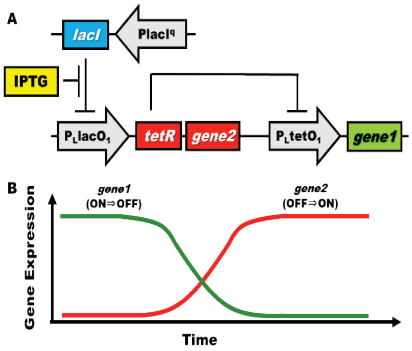


Fig.1 Artificial gene circuit of Toggle Switch(TS)(A), and dynamic behavior of gene expressions(B)

目的遺伝子である *gene1*（*yemGFP*）、*gene2*（*mCherry*）と *tetR* のリボソーム結合領域（RBS）配列を改変した株（TS 株（target）、TS 株（*tetR*））を構築し、目的遺伝子の発現量を観測した。RBS 配列は、RBS 配列と翻訳効率の関係を予測する RBS calculator（Salis, 2012）を用いて設計した。

TS 株（target）の誘導前 *yemGFP* および誘導後 *mCherry* の最大蛍光強度の制御範囲は RBS 配列を改変していないコントロール株のそれに比して、それぞれ 70%～120%および 50%～200%であった。また、TS 株（*tetR*）の *yemGFP* の蛍光強度の半減期の制御範囲は 2～7 時間であった。以上の結果は、RBS 改変による誘導前後の遺伝子発現量ならびに状態遷移時間の制御が可能であることを示した。今後は、この回路を用いて代謝バランスの最適化を行い、物質生産性向上の可能性を検討する。

We used an artificial gene circuit named toggle switch(Fig1.A) to switch the metabolic state of *E. coli*, and improved the material production efficiency. Controlling both the expression level of target gene and the state transition time for switch may realize further improvement of substance production efficiency. Therefore, in this study, we investigated the feasibility of "controlling the expression level of the target gene by modifying the translation efficiency" and "controlling the state transition time by modifying the translation efficiency of *tetR*". The translation efficiency was changed by modifying RBS sequence based on RBS calculator (Salis,2012). The control range of the maximum fluorescence intensity of the *yemGFP* (*gene1*) and *mCherry* (*gene2*) was 70% to 120% and 50% to 200%, respectively, as compared with those of the control strain. The control range of the half-life of the fluorescence intensity of *yemGFP* was 2 to 7 hours. These results indicated that it is possible to control the gene expression level and state transition time by modifying the translation efficiency.

Synthetic biology, Genetic circuit, Ribosome binding site

発表責任者：花井泰三（taizo@brs.kyushu-u.ac.jp）

講演番号：2B07-08
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 13:30～ ミーティングルーム B

Geobacillus 属好熱菌を宿主とした異種タンパク質高生産システム

A new host-vector system for hyperproduction of heterologous proteins

○倉敷 凌太[1]、小山 幸祐[2]、大城 隆[2]、鈴木 宏和[2]([1]鳥取大院・持続創生、[2]鳥取大・工)
○Ryota KURASHIKI[1], Kosuke KOYAMA[2], Takashi OHSHIRO[2], Hirokazu SUZUKI[2] ([1]Dept. Eng., Grad. Sch. Sust. Sci., Tottori Univ., [2]Fac. Eng., Tottori Univ.)

【目的】*Geobacillus* 属好熱菌は，増殖性やタンパク質生産性に優れた中等度好熱菌である。以前の研究で我々は，*Geobacillus kaustophilus* HTA426 で機能する高発現プロモーターを網羅的転写解析により見出した。本研究では，当該プロモーター（P_{hsp}）を用いた実践的タンパク質高生産ベクターの開発を目的とした。

【方法・結果】以前に構築した pGKE119 ベクターに P_{hsp} を連結し，pKR02 を得た。ところが P_{hsp} は大腸菌でも高度に機能し，その下流にクローニングできない遺伝子が数多く見出された。そこで error-prone PCR を用いて P_{hsp} 配列にランダム変異を導入し，大腸菌での機能性が下がったプロモーターを探索した。その際のレポーターには，蛍光タンパク質遺伝子（*venus*）を用いた。大腸菌での機能性が下がり，好熱菌では高発現を指揮する変異型プロモーターが 2 つ得られた。それらプロモーターを pGKE119 ベクターに連結し，pKR03 および pKR04 を得た。プロモーター下流に *venus* 遺伝子を挿入し，様々な *Geobacillus* 属好熱菌へ導入したところ，様々な株で Venus 生産が確認できた。電気穿孔法で DNA を導入できる *G. thermodenitrificans* K1041 株では, pKR04 を用いた場合に 0.4 g/L 培地の Venus 生産が見られた。pKR04 にキシラナーゼ遺伝子（*xynA*）を挿入し，K1041 株に導入した場合は，キシラナーゼが 1 g/L 培地の生産レベルで培養液中に生産された。安価なコーンスティープリカー培地でも同様な生産レベルが見られた。pKR04 と K1041 株は，細胞内および細胞外タンパク質生産のための新たな宿主ベクター系として有用と期待できる。

Geobacillus spp. are moderate thermophiles that are excellent in cell growth and protein productivity. In the previous work, we identified a robust promoter (P_{hsp}) that functioned in *Geobacillus kaustophilus* HTA426. This study aimed to develop a plasmid vector that carried P_{hsp} and can direct protein hyperproduction in *Geobacillus* spp. The promoter was cloned in pGKE119 to obtain pKR02. However, the plasmid could not be used to clone several gene potentially because P_{hsp} notably functioned in *Escherichia coli*. Therefore, P_{hsp} was mutated using error-prone PCR to generate mutant promoters that functioned less in *E. coli*. The experiment provided two promoters, which were cloned in pGKE119 to give pKR03 and pKR04. Especially, pKR04 directed protein hyperproduction in *G. thermodenitrificans* K1041, which is transformable by electroporation. The productivity was 0.4 g/L culture. In addition, pKR04 directed extracellular production of xylanase in *G. thermodenitrificans* K1041, with a productivity of 1 g/L culture.

Geobacillus, extracellular protein production, thermophile

発表責任者：鈴木宏和（hirokazusuzuki@tottori-u.ac.jp）

講演番号：2B07-09
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 13:30～ ミーティングルーム B

麹菌 *Aspergillus oryzae* における転写因子 TrsA と TrsB による菌核形成制御機構の解析

Functional analysis of transcription factors TrsA and TrsB in regulation of sclerotia formation in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*

○皆川 春香[1]、片山 琢也[1,2]、岡 大椰[3]、小川 真弘[4]、兒島 孝明[3]、中野 秀雄[3]、小山 泰二[4]、北本勝ひこ[5]、丸山 潤一[1,2]([1]東大院・農生科・応生工、[2]東大・微生物連携機構、[3]名大院・生命農、[4]野田産研、[5]日薬大・薬)

○ Haruka MINAGAWA[1], Takuya KATAYAMA[1,2], Hiroya OKA[3], Masahiro OGAWA[4], Takaaki KOJIMA[3], Hideo NAKANO[3], Yasuji KOYAMA[4], Katsuhiko KITAMOTO[5], Jun-ichi MARUYAMA[1,2] ([1]Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo, [2]CRIIM, UTokyo, [3]Grad. Sch. Bioagric. Sci. Nagoya Univ., [4]Noda Inst. Sci. Res., [5]Nihon Pharmaceutical Univ.)

麹菌 *Aspergillus oryzae* では有性世代が発見されておらず、有性生殖による交配育種が不可能である。近縁種では無性的に形成される耐久性の分化構造である菌核の内部に有性生殖器官が形成されることが報告されているが、*A. oryzae* の菌核形成能は低下あるいは消失している。我々はこれまでに、*A. oryzae* におけるスクリーニングから新規 Zn(II)Cys6 型転写因子 TrsA と TrsB が菌核形成に必要であることを見いだした[1)]。本研究では、TrsA と TrsB が直接制御する遺伝子を同定することで、菌核形成の制御における分子メカニズムの解明を目的とした。

一般的に Zn(II)Cys6 型転写因子は二量体を形成することが多いことが知られている。共免疫沈降実験により、TrsA と TrsB、TrsA 同士、TrsB 同士が相互作用をすることが明らかになった。一方で、過剰発現実験において、TrsA では菌核数が野生型と同等であったのに対し、TrsB では菌核形成が抑制された。これらのことから、TrsA と TrsB の結合の組み合わせに依存して制御される遺伝子が変化する可能性が考えられた。また、ChIP-seq と gSELEX-seq の結果から TrsA および TrsB が直接制御する遺伝子の候補が得られたことで、各転写因子遺伝子の過剰発現・破壊による RNA-seq 解析の結果とあわせ、これらの転写因子が直接制御する遺伝子の同定を試みている。

1) 中村英淳ら 第 67 回日本生物工学会大会要旨集 p.89 (2015)

No sexual cycle has been found in the industrial filamentous fungus *Aspergillus oryzae*. It was reported that sexual reproduction structures are formed inside the sclerotium, an asexual survival structure, in its closely related species, but *A. oryzae* strains have lost the ability to form sclerotia or have a much lower ability. We previously found novel Zn(II)Cys6-type transcription factors TrsA and TrsB required for sclerotia formation. Here, by identifying the genes directly regulated with TrsA and TrsB, we aimed to elucidate the molecular mechanism in regulation of sclerotia formation.

Co-immunoprecipitation revealed homomeric/heteromeric interactions of TrsA and TrsB, but overexpression of TrsA and TrsB differentially affected the formation of sclerotia, suggesting the possibility that the regulated genes vary dependently on the functional combinations of TrsA and TrsB. ChIP-seq and gSELEX-seq analyses provided candidate genes directly regulated by TrsA and TrsB. Along with RNA-seq analysis in overexpression/deletion, we will discuss the regulatory relationships with the transcription factors TrsA and TrsB.

Aspergillus oryzae, sclerotia, transcription factor

発表責任者：丸山 潤一（amarujun@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2B07-10
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 13:30～ ミーティングルーム B

セルロース分解性昆虫共生ストレプトミセス属放線菌における、マンノース/マンノビオース応答性の解明

Mannose and mannobiose specific responses of insect associated cellulolytic *Streptomyces*.

○大橋 慧介[1]、幡谷 省悟[2]、中田 朱音[1]、松本 一樹[1]、加藤 夏海[2]、キャメロン カリー[3]、ブライアン フォックス[3]、高須賀 太一[1,2] ([1]北大国際食、[2]北大農、[3]ウィスコンシン大)
○ Keisuke OHASHI[1], Shogo HATAYA[2], Akane NAKATA[1], Kazuki MATSUMOTO[1], Natsumi KATO[2], Currie Cameron R.[3], Fox Brian G.[3], Taichi TAKASUKA[1,2] ([1]Graduate School of Global Food Resources, Hokkaido Univ, [2]School of Agriculture, Hokkaido Univ, [3]University of Wisconsin-Madison)

セルロース分解性昆虫共生細菌である、*Streptomyces* sp. SirexAA-E 株は、細胞外に存在する糖質の種類に応じて、様々な多糖分解酵素を分泌する。しかしながら、主要な植物細胞壁構成多糖であるマンナンに対する酵素分泌応答については、ほとんど報告がない。本研究では、本菌のマンナン特異的な酵素分泌を明らかにするために、ガラクトマンナンをはじめ異なる 4 種の単一炭素源を加えて液体培養し、各培養上清に含まれるタンパク質の網羅的解析を行った。その結果、マンノースおよび多糖類による、複数のセルロース・マンナン分解酵素の発現誘導を確認した。そのうち、マンノースおよびガラクトマンナン特異的に分泌された 2 種のマンナン分解酵素の転写制御機構の解明を試みた。ゲノム解析から推定された転写制御因子とその結合部位（5’-GACAACGTTGTC- 3’）について、異種発現タンパク質を用いた DNA-タンパク質結合実験を行い、新規のマンノース/マンノビオース応答性リプレッサーを同定した。加えて、マンノビオースは既報のセロビオース応答性リプレッサーのエフェクターリガンドである事を明らかにした。これらの結果から、本菌のマンナン代謝系における、複数のリプレッサーによる資化関連タンパク質の遺伝子発現制御が示唆された。

The cellulolytic insect symbiont bacterium, *Streptomyces* sp. SirexAA-E (SirexAA-E), secretes a suite of plant cell wall-degrading enzymes in response to the available carbon sources. In this study, we sought to examine a poorly understood its response to mannan, one of the major components of the plant cell wall. SirexAA-E grew well with glucose, mannose, cellulose, and galactomannan as a sole carbon source. The proteomic analysis of secreted proteins in each culture supernatant indicated that mannose and two polysaccharides induced the secretion of mannan and cellulose-degrading enzymes. We found two α-1,2-mannosidases that were secreted during the growth on mannose and galactomannan. By genomic analysis, we found a unique 12 bp motif (5’-GACAACGTTGTC-3’) at 4 locations in the SirexAA-E genome, two of which were found upstream of genes encoding the above-mentioned α-1,2-mannosidases, along with a putative mannose and mannobiose responsive transcriptional regulator. This novel regulator was determined to be a repressor by *in vitro* binding assays. Furthermore, the previously reported cellobiose-responsive repressor was determined to also use mannobiose as an effector ligand. These results provide a model for a mannose utilization system controlled by multiple transcriptional regulators in the cellulolytic insect-associated *Streptomyces*.

Biomass degradation, Transcriptional regulation, Proteomics analysis

講演番号：2B07-11
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 13:30～ ミーティングルーム B

セルロース分解性ストレプトマイセス属における、恒常的な酵素産生を目指した CRISPR/Cas によるゲノム編集技術の確立

Establishment of CRISPR/Cas system in the cellulolytic Streptomyces mutants for constitutive biomass-degrading enzyme secretion

○中田 朱音[1,2]、大橋 彗介[1,2]、高須賀 太一[1,2] ([1]北海道大学、[2]北海道大学大学院国際食資源学院)
○Akane NAKATA[1,2], Keisuke OHASHI[1,2], Taichi TAKASUKA[1,2] ([1]Hokkaido Univ., [2]Hokkaido Univ. GFR)

私達の研究対象である放線菌(*Streptomyces* sp. SirexAA-E)は、自然界で木食害性昆虫と共生しており、周囲の炭素源に応じてバイオマス分解酵素を分泌する。これら分解酵素がより効率的に分泌されれば、バイオマスエネルギー生産技術の更なる発展が期待できる。本放線菌のバイオマス分解酵素遺伝子の多くは、発現が転写調節因子により制御されており、その中でもセルロース分解酵素をコードする複数の遺伝子は、CebR リプレッサーにより発現が抑制されている。先行研究では、従来の遺伝子組換え技術により本放線菌の CebR 遺伝子欠損株作出し、本変異株がセルロース分解酵素を恒常的に分泌する事が報告された（Book et al., *PLoS Biol.* 2016）。最近の研究から、SirexAA-E には CebR 以外にも、バイオマス分解酵素遺伝子の発現に関わる転写制御因子を複数存在することが分かってきた。従って、複数の転写制御因子を同時に欠損した個体は、更に高いバイオマス分解能を示すことが予想される。しかしながら、SirexAA-E ゲノム上の複数の転写調節因子をコードした遺伝子を従来の遺伝子組換え技術で欠損させるためには、多大な労力を要する。そこで、私達は CRISPR/Cas 法による本放線菌のゲノム編集を確立した。得られたゲノム編集株については、標的転写調節因子遺伝子の欠損に伴う分泌酵素群の評価を、酵素学的手法およびプロテオミクス解析によって行っている。

We focus on *Streptomyces* sp. SirexAA-E, which is associated with a wood-devastating insect, and is known to secrete enzymes for biomass degradation depending on the available carbon sources. If SirexAA-E can secrete these enzymes more effectively, it is potentially useful for biofuels productions from recalcitrant biomass. In SirexAA-E, the expression of many genes encoding biomass-degrading enzymes is regulated by transcriptional regulators, and cellulase-coding genes are known to be regulated by CebR repressor. A *cebr* deletion strain of SirexAA-E, created by a conventional recombinant method, showed constitutive productions of cellulases (Book et al., *PLoS Biol.* 2016). In addition to CebR, other important transcriptional regulators for producing plant biomass-degrading enzymes in SirexAA-E have been determined in our group, which would be other potential targets for gene deletions. However, conventional recombinant methods are tedious and time consuming. Thus, we made use of the CRISPR/Cas to edit the SirexAA-E genome. The genome edited SirexAA-E mutants have been tested biochemically, and secreted proteins have been evaluated by proteomics.

CRISPR/Cas, Biomass degrading *Streptomyces* sp., Transcriptional regulation

発表責任者：中田朱音（nakata.akane.e9@elms.hokudai.ac.jp）

講演番号：2B07-12
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 13:30～ ミーティングルーム B

壺造り黒酢由来乳酸菌の D-Ala 生産能と共培養が与える影響

D-Ala productivity of lactic acid bacteria from *Kurozu* and the effect of co-culture

○星 南穂子[1]、藤井 暁[2]、橋口 和典[2]、長野 正信[2]、亀谷 将史[1,3]、新井 博之[1,3]、石井 正治[1,3] ([1]東大院　農生科　応生工、[2]坂元醸造、[3]東大微生物連携機構)
○Naoko HOSHI[1], Akira FUJII[2], Kazunori HASHIGUCHI[2], Masanobu NAGANO[2], Masafumi KAMEYA[1,3], Hiroyuki ARAI[1,3], Masaharu ISHII[1,3] ([1]Dept. Biotechnol., Grad. Sch. Agric. Life Sci., Univ. Tokyo, [2]Sakamoto Kurozu, Inc, [3]CRIIM, Univ. Tokyo)

壺造り純米黒酢は、仕込み後に壺を野外に静置しておくと、壺や麹に内在する微生物によりほぼ人工的な操作なしで酢酸発酵まで発酵が進むという現象を用いて醸造される食酢である。この自然の力を用いた醸造方法は自然環境中の微生物相互作用のモデルとして注目されている。また、壺造り黒酢は近年その健康機能性が注目されている D-アミノ酸を多く含むことで注目されている食品であり、醸造過程で検出される乳酸菌が D-アミノ酸を生産していると予想されている。

これらの事実をふまえて過去に我々は、黒酢発酵液から単離した乳酸菌の菌体外への D-アミノ酸蓄積能を既知の D-アミノ酸高生産乳酸菌と比較したところ、黒酢由来乳酸菌は D-Ala を多量に蓄積することが分かった。また、この黒酢由来乳酸菌は高いアラニンラセマーゼ活性を持つことが示されている。

そこで、壺造り黒酢の醸造方法の特徴である微生物の相互作用に注目して、黒酢由来乳酸菌と黒酢由来のその他の微生物を共培養し、単独培養時と D-Ala 生産量を比較した。その結果、共培養時に D-Ala 生産量が向上することが示された。

Kurozu (jar fermented rice black vinegar) is brewed by microbes present in a jar and *koji*, without artificial addition of specific microbes. This brewing method is attracting attention as a model of microbial interaction in the natural environment. In addition, high concentrations of D-amino acids are accumulated in *Kurozu*. It is expected that lactic acid bacteria (LAB) detected during the brewing process produce the D-amino acids.

Based on these facts, we compared the D-amino acid productivity of LAB isolated from *Kurozu* with known D-amino-acid-producing LAB. The LAB from *Kurozu* accumulated larger amounts of D-Ala and exhibited high alanine racemase activity.

To investigate the effect of microbial interaction on the D-amino acid productivity, the LAB were co-cultured with other microorganisms isolated from *Kurozu*. Co-cultivation with these microorganisms was shown to increase the D-Ala productivity of the LAB.

lactic acid bacteria, D-amino acid, co-culture

講演番号：2B07-13
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 13:30～ ミーティングルーム B

乳酸菌 *Marinilactibatillus psychrotolerans* B7-9-5 株における好気的酢酸生成に関与する酵素の機能解析

Functional analysis of enzymes involved in aerobic acetate production in lactate catabolism in halo-alkaliphilic lactic acid bacterium *Marinilactibatillus psychrotolerans* strain B7-9-5

○杉山 南、海野 良輔、松山 未央子、鈴木 敏弘、石川 森夫（東農大院・醸造）
○ Minami SUGIYAMA, Ryosuke UNNO, Mioko MATSUYAMA, Toshihiro SUZUKI, Morio ISHIKAWA (Dept. Ferment. Sci., Tokyo Univ. of Agric.)

【背景・目的】 熟成チーズにおける特徴的な味やフレーバーは、熟成過程で自然発生的に増殖する微生物により生成されていると考えられている。*Marinilactibatillus psychrotolerans* B7-9-5株は、熟成チーズから分離された好塩性・好アルカリ性乳酸菌であり、好気条件下で乳酸を資化して酢酸を生成する。酢酸はチーズフレーバーの主要成分の一つであるため、その生成に本菌株が関与している可能性が考えられるが、その生成メカニズムは明らかとなっていない現状がある。本研究では、*M. psychrotolerans* B-7-9-5株の好気的乳酸資化能とそれに伴う酢酸生成経路のメカニズムを明らかにすることを目的とし、酢酸生成に関与する酵素の生成と特徴について調べた。

【実験方法】 ドラフトゲノム解析はIllumina Hiseq2500ゲノムシークエンサーにより行い、アノテーションと代謝経路の作製をおこなった。各酵素はIntein-Tag融合タンパク質として大腸菌で発現させ、Tagを除去したものを酵素解析に用い、酵素反応に付随するH_2O_2及び、NADHの増減を調べた。

【結果・考察】 好気条件下での酢酸生成に関する遺伝子とそれに関連する遺伝子群の存在を調べるためにドラフトゲノム解析を行った。その結果、B7-9-5株は酢酸生成に関連する“Lactate oxidase (LOX)”, “NADH oxidase (NOX)”, “NADH peroxidase (NPX)”の3つの酵素遺伝子を持つことが分かった。次に、これら酵素遺伝子の機能について精製酵素を用いて解析した。Intein-Tag融合タンパク質として*E. coli* BL21(DE3)で発現させた酵素を、SDS-PAGEで単一バンドになるまで精製した。精製酵素を用いて酵素反応に付随するH_2O_2の発生またはNADHの減少を指標にして酵素活性を測定したところ、LOXの添加によりH_2O_2の増加が確認された。また、NOXの酵素活性についても同様に、精製酵素の添加によりNADHが減少した。このことから、LOXとNOXは乳酸から酢酸への変換の一部を担う酵素であることが示唆された。現在、LOXにより生成したH_2O_2処理に重要であると思われるNPXの発現・精製と酵素解析を行っている段階である。

Marinilactibacillus psychrotolerans B7-9-5, a halophilic and alkaliphilic lactic acid bacterium, can convert lactate to acetate under the aerobic condition and plays an important role in the production of cheese flavors. To analyze the aerobic metabolic pathway for acetate production, draft genome analysis and enzyme purification were performed. This strain possessed the three kinds of specific enzymes, lactate oxidase, NADH oxidase, and NADH peroxidase, from draft genome sequence. Their recombinant enzymes expressed from *E. coli* showed the enzyme activity. These results indicate that these enzymes function in lactate catabolism and acetate production in this strain.

lactic acid bacteria, acetate production, lactate oxidase

発表責任者：石川森夫（m1ishika@nodai.ac.jp）

講演番号：2B07-14
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 13:30～ ミーティングルーム B

阿波晩茶の発酵に関与する乳酸菌の地域多様性と生理活性評価

Regional diversity and bioactivity of lactic acid bacteria involved in the fermentation of Awa-bancha

○西岡 浩貴[1,2]、大野 智生[3]、岩橋 均[4]、堀江 祐範[5]([1]徳島県工技セ、[2]岐阜大院・連合農学、[3]岐阜大院・自然科技、[4]岐阜大・応用生物、[5]産総研・健康医工学)
○Hiroki NISHIOKA[1,2], Tomoki OHNO[3], Hitoshi IWAHASHI[4], Masanori HORIE[5] ([1]Tokushima Prefectural Industrial Technology Center, [2]United Graduate School of Agricultural Science, Gifu Univ., [3]Graduate School of National Science and Technology, Gifu Univ., [4]Faculty of Applied Biological Sciences, Gifu Univ., [5]Health and Medical Research Institute, AIST.)

阿波晩茶は徳島県で生産され、乳酸菌等の微生物によりつくられる後発酵茶である。主な生産地は那賀町と上勝町であるが、近年は三好市でも生産されている。阿波晩茶の風味は生産者ごとに個性がある。阿波晩茶の個性は生産地域に生息する乳酸菌の多様性が影響していると考え、これまで検討を行ってきた。2019年に各生産地域から分離した乳酸菌を遺伝子解析により同定したところ、那賀町と上勝町では*Lactobacullus pentosus*、三好市では*Lactobacillus plantarum*が優占していた。本研究では、2020年に生産された阿波晩茶から乳酸菌を分離し、菌種を同定して2019年との比較を行った。また、阿波晩茶から分離された乳酸菌の応用を検討するため、生理活性を評価した。

発酵後の茶葉からMRS寒天平板を用いて乳酸菌を分離し、遺伝子解析により同定したところ、那賀町と上勝町では*L. pentosus*、三好市では*L. plantarum*が優占しており、2019年と同様の傾向であった。乳酸菌の生理活性評価では、γ-アミノ酪酸を高生産する*Lactobacillus brevis*が確認された。また、人工消化液耐性と腸管上皮細胞に対する付着性の高い*L. pentosus*が確認され、プロバイオティクスとして有用であることが示唆された。

Awa-bancha is a post-fermented tea produced in Tokushima, it is made by microorganisms such as lactic acid bacteria. It is mainly produced in Naka and Kamikatsu, and in recent years it is also produced in Miyoshi. The flavor of Awa-bancha is unique to each producer. We considered that the individuality of Awa-bancha is influenced by the diversity of lactic acid bacteria that inhabit the production area, and we have been studying it so far. In 2019, as a result of identifying lactic acid bacteria isolated from each production area by genetic analysis, *Lactobacillus pentosus* was dominant in Naka and Kamikatsu, and *Lactobacillus plantarum* was dominant in Miyoshi. In this study, lactic acid bacteria were isolated from Awa-bancha produced in 2020, and the bacterial species were identified and compared with 2019. In addition, the physiological activity was evaluated to examine the application of lactic acid bacteria isolated from Awa-bancha.

As a result of identifying lactic acid bacteria isolated from Awa-bancha in 2020, *L. pentosus* was dominant in Naka and Kamikatsu, and *L. plantarum* was dominant in Miyosh which was the same tendency as 2019. In the evaluation of the physiological activity of lactic acid bacteria, *Lactobacillus brevis* was obtained that produced high γ-aminobutyric acid. Furthermore, *L. pentosus* was obtained that was highly resistant to artificial digestive juices and highly adherent to intestinal epithelial cells, suggesting that it is useful as a probiotic.

Awa-bancha, Post-fermented tea, Lactic acid bacteria

発表責任者：西岡　浩貴（nishioka@itc.pref.tokushima.jp）

講演番号：2B07-15
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 13:30～ ミーティングルーム B

油脂生産酵母 *Rhodotorula toruloides* のオレイン酸含有量と油脂生産量向上に向けた研究
Enhancing lipid production and oleic acid content in *Rhodotorula toruloides* by overexpression of two fatty acid elongases

○高橋 祐斗[1]、呉 志展[1]、梶浦 裕之[1]、三崎 亮[1]、サビトリー リムトン[2]、藤山 和仁[1]([1]阪大・生物工学国際交流センター、[2]カセサート大農)
○ Yuto TAKAHASHI[1], Chih-Chan WU[1], Hiroyuki KAJIURA[1], Ryou MISAKI[1], Limtong SAVITREE[2], Kazuhito FUJIYAMA[1] ([1]Osaka Univ., [2]Kasetsart Univ.)

【目的】
近年、バイオディーゼル燃料(BDF)は化石燃料の代替エネルギー源として注目を集めている。私たちは、油脂生産酵母 *Rhodotorula toruloides* による、BDF 生産に注目した。現状の *R. toruloides* 由来の BDF は、品質や生産性に改善の余地がある。本研究では、BDF の高品質化に向け、BDF の劣化抑制と低温での使用を可能にするオレイン酸（OA）に焦点を当てた。この BDF 中の OA 組成比を増加させるため、OA 合成への関与が示唆される遺伝子、*R. toruloides ELO1*（*RtELO1*）、*R. toruloides ELO2*（*RtELO2*）を *R. toruloides* で過剰発現させ、両遺伝子の機能解析と BDF の品質の向上を目指した。
【方法】
RtELO1 と *RtELO2* の *R. toruloides* 発現用ベクターを構築するために、*RtELO1* と *RtELO2* の配列を、NCBI protein database から取得した。*R. toruloides* の genomic DNA から調製した *RtELO1* と *RtELO2* を使用し、構築したベクターを酢酸リチウム法で *R. toruloides* に導入することで形質転換体を得た。この形質転換体から抽出した油脂の、生産量と脂肪酸組成をガスクロマトグラフィーにより分析した。
【結果】
R. toruloides 内での *RtELO1* と *RtELO2* の過剰発現は、OA 含有量と油脂生産量の向上をもたらした。特に、*RtELO2* を過剰発現させた形質転換体では、野生株と比較して OA の組成比が大幅に増加し、OA の割合は全脂肪酸の約 80%を占めた。以上の結果より、*RtELO1* と *RtELO2* は *R. toruloides* においてミリスチン酸やパルミチン酸からステアリン酸への伸長反応に関与し、OA の高生産に利用できる可能性を示唆した。

Oleaginous yeast *Rhodotorula toruloides* is an attractive host for the biodiesel industry. In this study, in order to produce OA-enriched lipid in oleaginous yeast, *RtELO1* and *RtELO2* gene were overexpressed in *R. toruloides*. Overexpression of *RtELO1* or *RtELO2* resulted in the increase of OA content and lipid production. *RtELO2* overexpression especially produced larger amount of OA than WT, which amount accounted for around 80% of total lipid. These results suggested that *RtELO1* and *RtELO2* might involve in fatty acid elongation.

Lipid production, Oleaginous yeast, Biodiesel

発表責任者：藤山　和仁（fujiyama@icb.osaka-u.ac.jp）

講演番号：2B07-16
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 13:30～ ミーティングルーム B

油脂高生産に向けた *Rhodotorula toruloides* セルレニン耐性株の取得
Isolating cerulenin-resistant mutant of *Rhodotorula toruloides* suitable for enhanced lipid production

○南方 真実[1]、呉 志展[1]、梶浦 裕之[1]、三崎 亮[1]、サビトリー リムトン[2]、藤山 和仁[1]([1]阪大・生物工学国際交流センター、[2]カセサート大農)
○Mami MINAKATA[1], Chih-Chan WU[1], Hiroyuki KAJIURA[1], Ryo MISAKI[1], Limtong Savitree[2], Kazuhito FUJIYAMA[1] ([1]Osaka Univ., [2]Kasetsart Univ.)

【目的】
近年、地球温暖化などの環境問題を背景に、化石燃料の代替エネルギーとしてバイオディーゼルが注目されているが、その生産コストの高さが普及の妨げとなっている。そこで、バイオディーゼルの原料となる油脂をより安価に生産するための油脂源として、細胞内に多量の油脂を蓄積する「脂質酵母」が注目されている。脂質酵母は、従来のバイオディーゼル原料である植物と比べて、脂質含有率が高く、生育も速いため、効率的な脂質生産が可能である。本研究では、脂質酵母 *Rhodotorula toruloides* NBRC8766 を用いたバイオディーゼル生産の実用化に向け、より脂質生産性の向上した変異株の取得を目的とした。

【方法】
脂質生産性の向上した変異株の取得に向け、UV を用いた変異誘発により、脂肪酸の合成を阻害する抗生物質であるセルレニンへの耐性を示す変異株の取得を試みた。ここで得られた変異株の脂質生産能をガスクロマトグラフィーで分析し評価した。

【結果】
紫外線を用いた変異誘発の結果、セルレニン耐性株変異株 *R. toruloides* NBRC8766 M8 を得た。M8 は、野生株と比べて脂質生産量が約 2.8 倍に増加していた。また、脂肪酸の中でも酸化しにくく安定で燃料としての価値が高いとされるオレイン酸の割合は、野生型と比べて約 1.4 倍に増加した。

Oleaginous yeasts are promising lipid source for cost-effective biodiesel production. I tried improving the lipid production of the oleaginous yeast *Rhodotorula toruloides* NBRC8766 through UV mutagenesis and selection by cerulenin, an antibiotic which inhibits fatty acid synthesis. Cerulenin resistant NBRC8766 Mutant8 (M8) was obtained by this method. M8 showed 2.8-fold higher lipid production and 1.4-fold higher oleic acid content than wild type.

Lipid production, Oleaginous yeast, Biodiesel

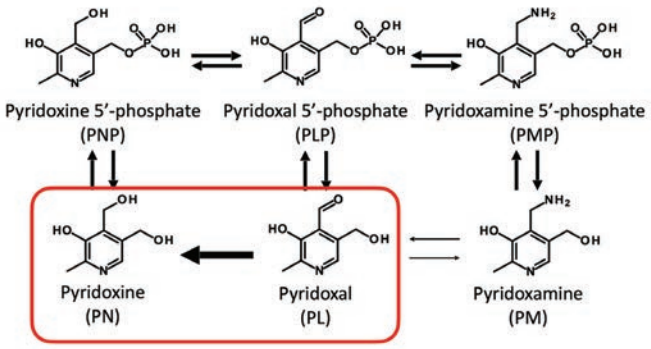
発表責任者：藤山和仁（fujiyama@icb.osaka-u.ac.jp）

講演番号：2C01-01
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 09:00～ ミーティングルーム C

哺乳類の PL レダクターゼ同定に向けた取り組み

Identification of mammalian PL reductase

○西山 尚来、伊藤 智和、邊見 久、吉村 徹 (名古屋大学)
○Takara NISHIYAMA, Tomokazu ITO, Hisashi HEMMI, Tohru YOSHIMURA (Nagoya Univ.)



ビタミン B_6 は 6 種の相互変換可能なビタマーとして存在し、このうちピリドキサールリン酸は、特にアミノ酸代謝において重要な役割を果たす。ビタマー間の相互変換を触媒する酵素の多くがビタミン B_6 恒常性の維持に重要な役割を果たすことが知られている。PL レダクターゼ(PLR)は、ピリドキサール (PL)のピリドキシン (PN)への還元を触媒する酵素で、一部の生物においてその存在が確認されている。 近年、哺乳類のビタミン B_6 代謝に PLR が関与する可能性が示唆されたが、その詳細は明らかではない。本研究では、ヒトの Aldo-Keto Reductase (AKR) superfamily に属する酵素の PLR 活性を示すか検証した結果について報告する。また、ブタ肝臓抽出液に見出した PLR の諸性質や、同活性を指標とした酵素精製過程について報告する。

Vitamin B_6 is present in the human body as six interconvertible vitamers, and among them, pyridoxal phosphate plays important role in amino acid metabolism. Enzymes that catalyze the interconversion of the vitamers play important roles in vitamin B_6 homeostasis. Some organisms possess PL reductase (PLR) that catalyzes the reduction of pyridoxal (PL) to pyridoxine (PN). Recent studies suggested the presence of PLR in mammals. We examined the PLR activity of a human enzyme belonging to the Aldo-Keto Reductase (AKR) superfamily, a possible candidate of PLR in humans. We detected PLR activity in the porcine liver extract, and the PLR was partially purified and characterized.

Vitamin B_6, Pyridoxal reductase, AKR superfamily

講演番号：2C01-02
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 09:00～ ミーティングルーム C

超好熱菌 *Thermotoga maritima* におけるスレオニンデヒドラターゼの同定及び機能解析

Identification and characterization of threonine dehydratase from the hyperthermophile *Thermotoga maritima*

○宮本 哲也、片根 真澄、齋藤 康昭、関根 正恵、本間 浩、加藤 くみ子（北里大薬）
○Tetsuya MIYAMOTO, Masumi KATANE, Yasuaki SAITOH, Masae SEKINE, Hiroshi HOMMA, Kumiko Sakai-Kato (Kitasato Univ.)

超好熱菌 *Thermotoga maritima* は、グラム陰性の嫌気性細菌であり、55℃ から 90℃ まで生育可能である。この細菌のペプチドグリカンには、一般的な構成要素である D-アラニン (D-Ala) と D-グルタミン酸 (D-Glu) に加えて、D-リジン (D-Lys) を含むという特徴がある。ペプチドグリカンに含まれる D-アミノ酸は、細菌の環境適応において重要であることが明らかとなっているが、*T. maritima* において D-アミノ酸代謝経路の全容は不明である。我々はこれまでに、*T. maritima* において D-Lys 合成を担う Lys ラセマーゼを同定している。しかしながら、その他の D-アミノ酸合成経路は正確に同定されていない。*T. maritima* はセリン (Ser) ラセマーゼと相同性の高いタンパク質を有しており、我々は本酵素の機能解析を行った。本酵素はピリドキサールリン酸 (PLP) 酵素であることを確認したが、アミノ酸ラセマーゼを有していなかった。その一方で、L-スレオニン (L-Thr) に対して強いデヒドラターゼ活性を示した。その他、L-Ser や L-*allo*-Thr に対しても同様の活性を示したが、これらの D 体に対しては活性を示さなかった。また、本酵素は基質によってアロステリック制御を受けることが明らかとなった。これらの酵素学的解析より、本酵素は biosynthetic Thr デヒドラターゼであることが明らかとなった。

A hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima* is Gram-negative and strictly anaerobic. It grows at temperatures between 55°C and 90°C. The peptidoglycan in *T. maritima* contains an unusual component, D-Lys, in addition to the typical D-Ala and D-Glu. The understanding of D-amino acid metabolism in *T. maritima* remains limited, although D-amino acids in the peptidoglycan are crucial for adaptation to environmental changes and resistance to environmental threats. In our previous study, we identified a Lys racemase that is presumably associated with D-Lys biosynthesis, whereas the biosynthetic pathways of other D-amino acid still remain unclear. Thus, we characterized enzymatic and properties of enzyme that shares a high amino-acid sequence identity with Ser racemase. This enzyme was a PLP-dependent enzyme. The enzyme did not display racemase activity toward amino acids including Ser, whereas dehydratase activity was highest toward L-Thr. It also acted on L-Ser and L-*allo*-Thr, but not on the corresponding D-amino acids. The catalytic mechanism displayed a sigmoidal dependence on substrate concentration. Collectively, this enzyme is a biosynthetic Thr dehydratase that catalyzes the conversion of L-Thr to α-ketobutyrate and ammonia.

Thermotoga maritima, Threonine dehydratase, D-Amino acid

講演番号：2C01-03
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 09:00～ ミーティングルーム C

Runella slithyformis 由来メチオニンアデノシルトランスフェラーゼの機能解析および *S*-アデノシルメチオニンの酵素合成

Functional analysis of methionine adenosyltransferase from *Runella slithyformis* and enzymatic synthesis of *S*-adenosylmethionine

○泉 しずく、佐分利 亘、森 春英（北大院農）
○Shizuku IZUMI, Wataru SABURI, Haruhide MORI (Hokkaido Univ.)

メチオニンアデノシルトランスフェラーゼ（MAT; EC 2.5.1.6）は，メチオニン（Met）および ATP から *S*-アデノシルメチオニン（SAM），ピロリン酸（PPi）およびリン酸（Pi）を生成する．MAT はバクテリア，植物，動物を含むすべての生物が保有する酵素である．生成される SAM は細胞内にてメチル基供与体として機能する．本研究では，*E. coli* 由来 MAT（EcMAT）と 51%の配列一致度を示す *Runella slithyformis* 由来の推定 MAT（RsMAT）の機能解析および SAM の酵素合成を検討した．

組換え RsMAT を大腸菌により生産した．無細胞抽出液から Ni キレーティングカラムクロマトグラフィーにより精製酵素を得た．本酵素は，5 mM ATP および 5 mM Met に対し 2.0 U/mg の比活性を示した．最適 pH は 7.0，最適温度は 50℃であった．本酵素は，pH 6.0–9.0（4℃，24 時間）で 80%以上，55℃以下（pH 8.0，15 分間）で 90%以上の活性を保持した．以上の性質は EcMAT と類似した．RsMAT の反応速度は，Pi および PPi の濃度依存的に低下し，100 mM Pi では 60%にまで，20 mM PPi では検出限界以下にまで低下した．RsMAT を pH 7.0 において 25 mM ATP および 25 mM Met に作用させた反応では，24 時間で 2.2 mM の SAM が合成された．

Methionine adenosyltransferase (MAT; EC 2.5.1.6) produces *S*-adenosylmethionine (SAM), pyrophosphate (PPi), and phosphate (Pi) from methionine (Met) and ATP. MAT from *Runella slithyformis* (RsMAT), which shows 51% sequence identity with MAT from *E. coli* (EcMAT), was characterized, and production of SAM using RsMAT was investigated.

Recombinant RsMAT with His tag at the N-terminus was produced by *E. coli* BL21 (DE3) transformants. RsMAT was purified by Ni chelating column chromatography. The specific activity of RsMAT was 2.0 U/mg for 5 mM ATP and 5 mM Met. The optimal pH and temperature were 7.0 and 50°C, respectively. RsMAT retained more than 80% and 90% of the original activity at pH 6.0–9.0 (4°C, 24 h) and below 55°C (pH 8.0, 15 min), respectively. These properties were similar to those of EcMAT. The reaction rate of RsMAT decreased in a concentration-dependent manner with Pi and PPi, down to 60% at 100 mM Pi and below the detection limit at 20 mM PPi. In the reaction of RsMAT with 25 mM Met and 25 mM ATP at pH 7.0, 2.2 mM SAM was synthesized in 24 h.

methionine adenosyltransferase, *S*-adenosylmetionine

発表責任者：泉　しずく（s_izumi@chem.agr.hokudai.ac.jp）

講演番号：2C01-04
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 09:00～ ミーティングルーム C

メチオニン生合成における MetW による MetX の活性制御

MetW regulates the enzymatic activity of MetX in methionine biosynthesis

○長谷部 文人（静岡県大・食）
○Fumihito HASEBE (Univ. of Shizuoka)

【目的】細菌のメチオニン生合成において、MetX は Homoserine *O*-acyltransferase として知られる。この MetX は、種によりフィードバック阻害の有無に差があり、その活性制御機構に多様性が存在する可能性が考えられた。*metX* に隣接する *metW* は、メチオニン生合成に関与する遺伝子として発見されたが、その機能は不明瞭であった。そこで本研究では、緑膿菌由来の MetW (PaMetW)および MetX (PaMetX)を対象とし、その比活性を測定することで、MetW の機能解明を目指した。

【方法と結果】大腸菌を宿主として取得した PaMetX/PaMetW と、反応に必要な基質や阻害候補化合物を混合し、30℃でインキュベートした後に LC-MS に供して産物である *O*-Succinyl-L-homoserine を検出し、その生産量から比活性を導出した。その結果、PaMetX 単独での比活性は 0.00485 U/mg であり、PaMetX と PaMetW 共存下での比活性は 2.89 U/mg であった。さらに、PaMetX 単独での条件では阻害候補剤の有無による顕著な差は見出されなかったが、PaMetW との共存下では *S*-Adenosyl-L-homocysteine (SAH)の添加時において、その比活性は 0.13 U/mg となり、非添加時の 4.5%まで減少することを明らかにした。また、PaMetW の SAM/SAH 結合部位と推測される残基の変異体を作製し、その比活性を導出した結果、SAH による阻害が緩和されることを明らかにした。

【Purpose】The enzyme MetX is a Homoserine *O*-acyltransferase utilized in the bacterial methionine biosynthetic pathway. There may be diversity in the regulating mechanism of the MetX because it is reported that there is a difference in feedback inhibition depends on species. The *metW* gene is found as a gene involved in the methionine biosynthesis adjacent to the *metX* gene, but its functions are unclear. In the present study, to elucidate the function of MetW, I investigated the enzymatic activity of MetW and MetX from *Pseudomonas aeruginosa* (PaMetW and PaMetX) in the presence or absence of inhibitor candidates.

【Methods and Results】 Recombinant PaMetX and PaMetW, purified from *E. coli*, were incubated with substrates at 30 ℃ in the presence or absence of inhibitor candidates. To detect *O*-Succinyl-L-homoserine and measure the enzymatic activity, the reaction mixtures were analyzed by LC-MS. The activity of PaMetX alone and PaMetX-PaMetW was 0.00485 and 2.89 U/mg, respectively. Furthermore, I elucidated that the activity of PaMetX-PaMetW was 0.13 U/mg, reduced to 4.5% by the addition of *S*-Adenosyl-L-homocysteine (SAH), although PaMetX alone showed no apparent difference. I also revealed that alanine-substitution of a residue annotated as a SAM/SAH binding site in PaMetW relieved feedback inhibition by SAH.

amino acid, Methionine biosynthesis, feedback inhibition

講演番号：2C01-05
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 09:00～ ミーティングルーム C

鞍掛豆 西山浸 98-5 由来 L-メチオニンγリアーゼの発現精製と性質検討

Expression, purification, and characterization of L-methionine γ-lyase form Kurakake soybeans Nishiyamahitashi 98-5.

○大川 敦司[1]、手嶋 琢[2]、松井 健二[2]、根本 理子[1]、田村 隆[1]、稲垣 賢二[1]([1]岡山大院・環境生命、[2]山口大院・創成科学)
○Atsushi Okawa[1], Takuya Teshima[2], Kenji Matsui[2], Michiko Nemoto[1], Takashi Tamura[1], Kenji Inagaki[1] ([1]Grad. Sch. Environ. Life Sci., Okayama Univ., [2]Grad. Sch. Sci. Tech. Innov., Yamaguchi Univ.)

【目的】L-メチオニンγ-リアーゼ(MGL)は補酵素としてピリドキサール 5’リン酸(PLP)を持ち，主に L-Met とその誘導体のα，γ脱離反応，L-Cys とその誘導体のα，β脱離反応を触媒する多機能酵素である。鞍掛豆の西山浸 98-5 は，煮ることで磯の香のするダイズ(*Glycine max*)の品種の一つである。この磯の香はジメチルスルフィドが原因物質であり，*S*-メチルメチオニンがその前駆体物質であることを明らかにした。また我々は，*S*-メチルメチオニンを高く蓄積する鞍掛豆は 3 つある MGL 遺伝子の一つである MGL1 遺伝子のイントロンへのトランスポゾン挿入により発現が抑制されており，それによって蓄積する L-Met の毒性を回避するため *S*-メチルメチオニンへと変換していることを明らかにした[1)]。そこで L-Met 代謝に関与する GmMGL1 の発現及び精製を行い，その性質について検討をおこなった。【方法】*G. max* 由来の MGL1 発現用プラスミド pET24a-GmMGL1 を構築し，*E. coli* Rosetta(DE3)を形質転換した。発現した GmMGL1 は TALON metal affinity を用いて精製した。酵素活性はケト酸量を MBTH(3-メチル-2-ベンゾチアゾロンヒドラゾン)法を用いて定量し決定した。【結果及び考察】GmMGL1 の精製は TALON カラムを用いることで，ほぼ単一に精製が可能であった。精製した組換え GmMGL1 は L-Met に対して約 1.0 U/mg，L-ホモシステイン(Hcy)に対して約 2.6 U/mg の比活性を有していた。反応最適 pH は 7.0 であり，最適温度は L-Met を基質にした場合が 45℃， L-Hcy の場合が 35℃と 10℃近い差が見られた。基質特異性は，L-Met，L-Hcy 以外に L-エチオニンに対して活性を示したが L-Cys に対する活性は確認できなかった。シロイヌナズナ由来の MGL と比較して L-Hcy に対する活性が非常に高いことが分かった。最適条件下で L-Met の速度論解析を行ったところ L-Met に対する見かけの K_m 値が 29 mM，k_{cat} が 1.1 s^{-1} であった。現在 GmMGL1 の結晶化を行うと共に，活性中心残基への変異導入による機能解析を試みている。

1) Teshima, T. *et al.*, *Plant Physiol.*,**183**, 943-956 (2020)

Kurakake soybeans (*Glycine max*) are one of the soybeans varieties that smell like sea odor when boiled. It was due to a transposon inserted in the intron of L-methionine γ-lyase (MGL) 1 gene. We expressed, purified, and characterized GmMGL1. GmMGL1 has activity for L-Met and L-Hcy about 1.0 U/mg and 2.6 U/mg, respectively. GmMGL1 has activity for L-Met, L-Hcy, and L-Ethionine. The optimum pH was 7.0, the optimum temperature was 45°C for L-Met and 35°C for L-Hcy. The K_m and k_{cat} values for L-Met were 29 mM and 1.1 s^{-1}, respectively.

pyridoxal-5'-phosphate, L-methionine γ-lyase, S-methyl methionine

発表責任者：大川敦司（pn2b9nr4@s.okayama-u.ac.jp）

講演番号:2C01-06
質疑応答日時、会場:3 月 19 日 09:00～ ミーティングルーム C

ホスファチジルグリセロール特異的ホスホリパーゼCの精製と異種組換え発現検討

Purification, characterization, and heterologous expression of phosphatidylglycerol-specific phospholipase C

○梶山 聖人[1]、杉森 大助[2]([1]福島大院、[2]福島大)
○Kiyoto KAJIYAMA[1], DAISUKE SUGIMORI[2] ([1]Grad school, Fukushima Univ, [2]Fukushima Univ)

【目的】近年，ミトコンドリアの質が老化や病気に関与していることがわかりはじめ，ミトコンドリア内膜に局在するホスファチジルグリセロール(PG)がそれらに深く関係することが報告されつつある．そこで，PG の酵素定量法の開発を目指し，PG 特異的ホスホリパーゼ C (PG-PLC)の精製と諸特性解析，異種組換え発現検討を行った．
【結果と考察】放線菌 *Amycolaptosis* sp. NT115 株の培養上清から PG-PLC をカラム精製した．本酵素は PG 以外のリン脂質にはほとんど作用しなかったことから，新規 PG-PLC であると結論づけた．本酵素は 54 kDa の単量体酵素であり，pH 6.0，55℃で最大活性を示した．また，本酵素は 50℃，30 min (pH 6.0)活性を 100%維持し，4℃，4 h インキュベートにおいて pH 4.0～9.0 という広範囲で安定であった．10 mM Al^{3+}存在下で約 1.3 倍活性が向上し，10 mM EDTA 存在下でも 100%の活性を示した．一方，10 mM Zn^{2+}存在下で約 50%まで活性が低下した．また，1% Triton X-100 存在下で最大活性を示し，1% コール酸 Na で約 20%まで活性が低下した．LC-MS/MS 解析により取得した内部アミノ酸配列を利用し，PCR 法により本酵素遺伝子をクローニング，アミノ酸配列全長を明らかにした。本酵素のアミノ酸配は *Amycolaptosis saalfeldensis* 由来メタロホスホエステラーゼ（Accession No.A0A1H8WLW2）と 83.2%一致した．本酵素遺伝子を発現ベクターpET24a に連結し，大腸菌 BL21(DE3)で発現させたところ微弱ながら活性が認められた。現在，高発現を目指し，種々発現系の検討を行っている．

In recent years, it has been revealing that mitochondrial quality may be involved in aging and disease. It has also been reported that phosphatidylglycerol (PG) localized in the inner mitochondrial membrane is deeply related to them. Therefore, with the aim of developing an enzyme quantification method for PG, we yielded PG-specific phospholipase C (PG-PLC) by a screening and performed purification and characterization of PG-PLC. We have produced recombinant PG-PLC using *Escherichia coli*. PG-PLC was purified from the culture supernatant of actinomycete *Amycolaptosis* sp. NT115 by usin column chromatography. PG-PLC had almost no activity on phospholipids other than PG. PG-PLC was a 54 kDa monomeric enzyme and showed maximum activity at pH 6.0 and 55 ℃. The enzyme maintained 100% activity at 50 ℃ and 30 min (pH 6.0), and was stable over a wide range of pH 4.0 to 9.0 at 4 ℃ for 4 h. The PG-PLC gene was cloning by PCR method, and the amino acid sequence shared 83.2% identity with metallophosphosterase of *Amycolaptosis saalfeldensis* (Accession No. A0A1H8WLW2). The PG-PLC gene was expressed by using pET24a and *E. coli* BL21 (DE3), and its weak activity was observed.

phosphatidylglycerol, phospholipase C, Amycolaptosis sp.

発表責任者:杉森大助(sugimori@sss.fukushima-u.ac.jp)

講演番号：2C01-07
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 09:00～ ミーティングルーム C

エタノールアミン型プラズマローゲン特異的ホスホリパーゼ D の異種組換え発現および機能解析

Production and enzymatic characterization of recombinant ethanolamine plasmalogen-specific phospholipase D

○野澤 俊貴[1]、川村 柚葉[1]、王 澤[2]、杉森 大助[2]（[1]福島大院理工、[2]福島大理工）
○Toshiki NOZAWA[1], Yuzuha KAWAMURA[1], Ze WANG[2], Daisuke SUGIMORI[2]（[1]Grad. Sch. Fukushima Univ., [2]Fukushima Univ.）

【背景・目的】
アルツハイマー症および軽度認知症患者の血中ではエタノールアミン型プラズマローゲン（PlsEtn）レベルが有意に低下することが報告されており，これら疾患の初期段階を検出するバイオマーカーとして期待されている．そこで，簡便かつ迅速・多検体同時分析可能な PlsEtn の酵素定量法の開発を目指し，放線菌 *Streptomyces* sp. AK461 由来 PlsEtn 特異的ホスホリパーゼ D（PlsEtn-PLD）の精製，遺伝子クローニング，異種組換え発現の検討を進めてきた。本発表では，各種発現系による PlsEtn-PLD 発現検討の結果と，組換え発現精製酵素を用いた諸特性解析結果について報告する。
【結果と考察】
PlsEtn-PLD 生産菌 *Streptomyces* sp. AK461 株のゲノム解析によって得られた CDS 情報と精製酵素の内部アミノ酸配列を照合することにより，PlsEtn-PLD 遺伝子（*plsetn-pld*）を推定した。*plsetn-pld* を大腸菌発現に最適化・全合成し，pET24a（C 末 His6 タグ付加）および pGEX-6p-1（N 末 GST タグ融合）を用いて発現させた。その結果，オートインダクション TB 培地を用いて培養（30℃，24 h）した pET24a 組換え体の無細胞抽出液（CFE）中に 0.430 U/mL （0.311 U/mg-protein）および LB 培地を用いた培養（37℃，2.5 h），誘導（1 mM IPTG，15℃，8 h）により pGEX-6p-1 組換え体の CFE 中に 0.516 U/mL （0.286 U/mg-protein）の活性を確認できた。現在，pGEX-6p-1 組換え体 CFE からアフィニティー精製を行い，精製酵素の諸特性解析を進めている。

Ethanolamine plasmalogen (PlsEtn) level has been reported to be significantly reduced in the blood of patients with mild cognitive impairment, and expected as a biomarker for its detection. Therefore, to develop a PlsEtn assay method using enzyme, PlsEtn-specific phospholipase D (PlsEtn-PLD) from *Streptomyces* sp. AK461 has been yielded by a screening, purified, and the gene (*plsetn-pld*) was cloned. A synthesized *plsetn-pld* was expressed using pET24a with C-terminal His6 tag and pGEX-6p-1 with N-terminal GST tag fusion using *E. coli* system. As a result, both transformant cells showed the enzyme activity: 0.430 U/mL (0.311 U/mg-protein) in cell-free extracts of the pET24a transformant and 0.516 U/mL (0.286 U/mg-protein) in those of the pGEX-6p-1 transformant, respectively. In our presentation, we report recombinant PlsEtn-PLD expression and the enzymatic characterization.

phospholipase D, ethanolamine plasmalogen, *Streptomyces* sp.

発表責任者：杉森大助（sugimori@sss.fukushima-u.ac.jp）

講演番号：2C01-08
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 09:00～ ミーティングルーム C

エタノールアミン型プラズマローゲン特異的ホスホリパーゼ D の基質特異性に及ぼす反応 pH，金属イオンの影響

Effect of pH and metal ions on substrate specificity of ethanolamine plasmalogen-specific phospholipase D

○川村 柚葉[1]、野澤 俊貴[1]、王 澤[2]、杉森 大助[2]（[1]福島大院理工、[2]福島大理工）
○ Yuzuha KAWAMURA[1], Toshiki NOZAWA[1], Ze WANG[2], Daisuke SUGIMORI[2] ([1]Grad. Sch. Fukushima Univ., [2]Fukushima Univ.)

【背景・目的】
エタノールアミン型プラズマローゲン（PlsEtn）は軽度認知症患者の血中で有意に減少することが報告されており，これら疾患の初期段階を検出するバイオマーカーとして期待されている。そこで，簡便かつ迅速・多検体同時分析可能な PlsEtn の酵素定量法の開発を目指し，*Streptomyces* sp. AK461 由来 PlsEtn 特異的ホスホリパーゼ D（PlsEtn-PLD）の異種組換え発現の検討と機能解析を進めてきた。本発表では組換え発現 PlsEtn-PLD の基質特異性と反応 pH, 金属イオンの関係について報告する。
【結果と考察】
大腸菌発現に最適化した全合成 PlsEtn-PLD 遺伝子（*plsetn-pld*）を pET24a（C 末 His6 タグ付加）に導入し，*E. coli* BL21(DE3)で発現させた。本酵素は 60℃付近で最大活性を示し，界面活性剤 Brij35 の添加によって活性が向上した。また，pH 4.5 および pH 8.5 で極大活性を示した。さらに，両 pH における金属イオンの影響を調べた結果，pH 4.5 では 1 mM Fe^{3+}, Cu^{2+}, Ni^{2+}, Al^{3+}, pH 8.5 では Fe^{2+}, Cu^{2+}, Co^{2+}, Mn^{2+}添加によって活性が向上した。pH 4.5 では Cu^{2+}, Al^{3+}添加，pH 8.5 では Cu^{2+}, Fe^{2+}添加によって基質特異性が低下した。一方，1 mM Mn^{2+}存在下，pH 8.5 では良好な基質特異性を示した。

Ethanolamine plasmalogen (PlsEtn) has been reported to be significantly declined in the blood of patients with mild cognitive impairment, and expected as a biomarker for its detection. Therefore, to explore a high-throughput assay method using enzymes, we have yielded PlsEtn-specific phospholipase D (PlsEtn-PLD) from *Streptomyces* sp. AK461 by a screening study, and the recombinant PlsEtn-PLD (rPlsEtn-PLD) with C-terminal His6 tag was produced by using *E. coli* BL21(DE3) and pET24a. In this presentation, we report the effects of pH and metal ions on the substrate specificity of rPlsEtn-PLD.
The rPlsEtn-PLD showed maximum activity at pH 4.5 or 8.5 and 60°C. The activity was enhanced in the presence of 0.008% Brij35. The enzyme activity was increased in the presence of 1 mM Fe^{3+}, Cu^{2+} or Al^{3+} at pH 4.5, and Fe^{2+}, Cu^{2+}, Co^{2+} or Mn^{2+} at pH 8.5. Interestingly, the highest activity and good substrate specificity were exhibited at pH 8.5 in the presence of 1 mM Mn^{2+}.

phospholipase D, ethanolamine plasmalogen, *Streptomyces* sp.

発表責任者：杉森大助（sugimori@sss.fukushima-u.ac.jp）

講演番号：2C01-09
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 09:00～ ミーティングルーム C

高基質特異性 L-グルタミン酸オキシダーゼの活性中心残基 Glu617 への飽和変異導入による機能解析

Functional analysis of active site residue Glu617 of L-glutamate oxidase by saturation mutagenesis

○矢野 佳果[1]、松尾 慎作[1]、伊藤 菜奈子[2]、今田 勝巳[2]、日下部 均[3]、根本 理子[1]、田村 隆[1]、稲垣 賢二[1] ([1]岡山大院・環境生命、[2]阪大院・理、[3]エンザイムセンサ)
○Yoshika Yano[1], Shinsaku Matsuo[1], Nanako Ito[2], Katsumi Imada[2], Hitoshi Kusakabe[3], Michiko Nemoto[1], Takashi Tamura[1], Kenji Inagaki[1] ([1]Grad. Sch. Env. and Life Sci., Okayama Univ., [2]Grad. Sch. Sci., Osaka Univ., [3]Enzyme Sensor Co. Ltd.)

【目的】*Streptomyces* 属由来 L-グルタミン酸オキシダーゼ (LGOX) は，L-Glu の酸化的脱アミノ反応を触媒する FAD 依存性 L-アミノ酸オキシダーゼの一種である。本酵素は L-Glu のみに作用するという厳格な基質特異性を示し，高活性かつ熱, pH に対して安定であることから, 酵素センサー等に実用化され，世界中で利用されている。我々は LGOX の 305 番目のアルギニン残基 (Arg305) が LGOX の基質認識の key residue であることを明らかにし，R305 への変異導入により，L-His，L-Arg，L-Tyr などに高い活性を示す基質特異性改変酵素の作製に成功した[1,2]。特に R305E 変異酵素は L-アルギニンオキシダーゼの性質を示し，X 線結晶構造解析から，基質 L-Arg は Glu305 残基の他に 617 番目のグルタミン酸残基と相互作用していることが明らかとなった。本研究では Glu617 の機能解明に向け Glu617 への飽和変異導入を行い，性質検討を行った。【方法】変異 LGOX は，部位特異的変異導入により作製した発現ベクターを *E. coli* JM109 に導入し，発現精製した。酵素活性は，反応生成物である過酸化水素，α-ケト酸を定量することで測定した。【結果及び考察】19 種の E617X 変異 LGOX を作製し，精製と性質検討を行った。多くの変異酵素では，比活性は減少したものの L-Glu に対する高い活性を維持していた。この理由としては，key residue の Arg305 の存在が考えられる。一方で LGOX 特有の厳格な特異性が崩れ，芳香族アミノ酸等に対する活性を新たに獲得した変異酵素も得られた。特に E617K，F，W 変異 LGOX は，L-Tyr に対する高い活性を獲得し，L-チロシンオキシダーゼと言える酵素の性質を示した。本研究により Glu617 は LGOX の厳格な基質特異性に寄与していることが示されるとともに，Arg305 に加えて Glu617 への 1 アミノ酸置換によっても基質特異性を変化させることが可能であることが示された。

L-Glutamate oxidase (LGOX) from *Streptomyces* sp. X-119-6 catalyzes the oxidative deamination of L-glutamate to form a 2-ketoglutarate, ammonia, hydrogen peroxide. LGOX has strict substrate specificity and high stability. We found that Arg305 in the active site of LGOX is a key residue for substrate recognition[2]. We also solved the ligand complex structures of LGOX R305E and found that Glu617 in the active site interacted with L-Arg as the substrate by hydrogen bonds. For analyzing the role of Glu617, we engineered LGOX E617X by saturation mutagenesis. From the results, we assumed that Glu617 is related to the strict substrate specificity of LGOX.

1) Arima, J., *et al.*, *FEBS Journal*, **276**, 3894-3903 (2009).
2) Utsumi, T., *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **417**, 951-955 (2012)

L-glutamate oxidase, substrate specificity, saturation mutagenesis

発表責任者：稲垣賢二（kinagaki@okayama-u.ac.jp）

講演番号：2C01-10
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 09:00～ ミーティングルーム C

リジン高生産を目的としたホモクエン酸シンターゼ Lys20 の高機能化

Engineering of homocitrate synthase Lys20 for high production of lysine in *Saccharomyces cerevisiae*

○松下 智紀、磯貝 章太、西村 明、高木 博史（奈良先端大・バイオ）
○Tomonori MATSUSHITA, Shota ISOGAI, Akira NISHIMURA, Hiroshi TAKAGI (Grad. Sch. Sci. Tech., NAIST)

リジンは必須アミノ酸の一つであるが、我々が主食とする米や小麦における含量が特に少ないため、積極的かつ意識的な摂取が推奨されている。従って、多くの発酵食品に用いられる酵母 *Saccharomyces cerevisiae* にリジンを蓄積させることは食品の高付加価値化に貢献できる。酵母におけるリジン合成の律速酵素は初発段階を触媒するホモクエン酸シンターゼ Lys20 であり、その活性は最終代謝産物であるリジンによって強くフィードバック阻害を受ける。当研究室では、これまでに変異誘発剤を用いたランダム変異導入によって、リジンを高生産する変異株を取得している。本研究では、Lys20 の立体構造モデルを用いて、アミノ酸置換がリガンド結合性に及ぼす影響を *in silico* 解析することで、Lys20 を理論的かつ効率的に高機能化させることを試みた。

先ず、Lys20 分子内の既知のアミノ酸置換部位（Ser385）の最適化を行うため、Lys20 の立体構造をホモロジーモデリングにより構築した。次に、野生型 Lys20 とリガンドとの結合性をドッキングシミュレーションにより算出したところ、基質である 2-オキソグルタル酸（2-OG）に比べ、阻害剤であるリジンが結合した時の自由エネルギーの方が低いことが示された。このことから、野生型 Lys20 では 2-OG よりもリジンとより強く結合すると考えられた。さらに、Lys20 の Ser385 を他のアミノ酸残基に置換した場合のリガンド結合性を算出した。その結果、Ser385 の Glu 置換体（S385E）は野生型と異なり、2-OG 結合時の自由エネルギーがリジン結合時よりも低いことが判明した。これらのことから、S385E はリジンよりも 2-OG と強く結合することが予想され、フィードバック阻害感受性が低下する可能性が示された。これらを検証するために、野生型および各置換型 Lys20 の組換え酵素を精製し、リジンによるフィードバック阻害感受性を検討した。その結果、*in silico* 解析で推測された通り、S385E は野生型と比べてフィードバック阻害感受性が大幅に低下していた。最後に、S385E が細胞内リジン合成量に与える影響を検討したところ、S385E 発現株は野生株や既知の変異型 Lys20 発現株と比べてリジン含量が著しく増加した。以上の結果から、*in silico* 解析により見出した Lys20 のアミノ酸置換（S385E）はリジン合成量のさらなる増加に寄与することを明らかにした。

Lysine is an essential amino acid in human, but is poorly contained in staple foods. We obtained lysine-accumulating mutants of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* via an *in silico*-design of the homocitrate synthase Lys20, a key enzyme in lysine biosynthesis. We here designed the novel variant of Lys20 (S385E) that favors binding of the substrate 2-oxoglutarate, leading to the higher lysine productivity.

lysine, homocitrate synthase, in silico-design

発表責任者：松下智紀（matsushita.tomonori.mt6@bs.naist.jp）

講演番号：2C01-11
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 09:00～ ミーティングルーム C

Saccharomyces cerevisiae の D-アミノ酸 *N*-アセチルトランスフェラーゼ(HPA3)の構造と機能に関する研究

Studies on the structure and function of D-amino acid *N*-acetyltransferase (HPA3) of *Saccharomyces cerevisiae*

○坂神 晴菜、伊藤 智和、岩崎 雄吾、邊見 久、吉村 徹 (名大院・生命農)
○Haruna SAKAGAMI, Tomokazu ITO, Yugo IWASAKI, Hisashi HEMMI, Tohru YOSHIMURA (Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya Univ.)

Saccharomyces cerevisiae の HPA2、HPA3 は、アセチル CoA からヒストンやポリアミンなどのアミノ基へのアセチル基の転移を触媒する Gcn5 関連 *N*-アセチルトランスフェラーゼ （GNAT）スーパーファミリーに属し、49%の配列同一性と 81%の配列類似性を有する。HPA2 がヒストンのアセチル化を触媒するものの、HPA3 はヒストンにはほとんど作用せず、様々な D-アミノ酸をアセチル化することが知られている。一方 HPA2 の D-アミノ酸に対するアセチル化活性は極めて低く、D-Ser を基質にした場合の活性は HPA3 の 1/2000 程度である。本研究では、高い配列相同性を持つ両酵素の基質特異性の違いの要因の解明を目的とした。

すでに結晶構造が明らかとなっている HPA2 の情報をもとに、HPA3 の構造モデリングを行った。両酵素の推定活性中心部位の構造を比較したところ、顕著な違いとして HPA3 の Q38 が HPA2 では Y33 に対応することが見出された。そこで HPA2 の Y33Q 変異型酵素を作製したところ、D-Ser に対するアセチル化活性は、野生型 HPA2 の *V*max、40.1 nmol/min/mg から 3.16 μmol/min/mg に上昇した。これは野生型 HPA3 の *V*max、66.1 μmol/min/mg の約 1/20 にあたる。一方、HPA3 の Q38Y 変異体を作成したところ、D-Ser に対する活性は 1/100 程度まで減少した。これらの結果から、HPA3 の D-アミノ酸アセチル化活性には Q38 が重要な役割を担っていることが明らかとなった。

なお本研究では、それぞれ HPA3 の D134 と HPA2 の D129 が基質アミノ基の脱プロトン化を担い、Y144 と Y139 が CoA の SH 生成の際のプロトン化を担う可能性も明らかにしたので報告する。

HPA2 and HPA3 of *Saccharomyces cerevisiae* belong to the Gcn5-related *N*-acetyltransferase (GNAT) superfamily. HPA2 catalyzes a histone acetylation, but HPA3 has little activity on histones and acetylates various D-amino acids, although HPA2 and HPA3 exhibit 49% sequence identity and 81% homology. We tried to elucidate the factors behind the difference in substrate specificity between the two enzymes through site-directed mutagenesis studies. We found that mutation of Q38 of HPA3 to Y decreased the D-amino acid *N*-acetyltransferase activity to 1%, and the mutation of the corresponding residue HPA2, Y33, to Q increased the activity to 80 times.
.

D-amino acid N-acetyltransferase, D-amino acid, GNAT family

講演番号：2C01-12
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 09:00～ ミーティングルーム C

GH136 に属するラクト-*N*-ビオシダーゼホモログの結晶構造解析

Crystal structures of glycoside hydrolase family 136 lacto-*N*-biosidase homologs

○山田 千早[1,2]、片山 高嶺[3]、伏信 進矢[1,2]（[1]東大院・農生科、[2]東大 微生物連携機構、[3]京大院・生命）
○ Chihaya YAMADA[1,2], Takane KATAYAMA[3], Shinya FUSHINOBU[1,2] ([1]The Univ. of Tokyo, [2]CRIIM, UTokyo, [3]Kyoto Univ.)

乳児の腸内に生息するビフィズス菌のうちの *Bifidobacterium bifidum* と一部の *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* は、ラクト-*N*-ビオシダーゼ（LNBase）を持ち、母乳中に含まれるヒトミルクオリゴ糖の主要骨格であるラクト-*N*-テトラオースからラクト-*N*-ビオース I（LNB）を菌体外で切り出して取り込み資化する。*B. bifidum* 由来の LNBase（LnbB）は Glycoside Hydrolase ファミリー20 に属し、*B. longum* 由来の LNBase（LnbX）は Glycoside Hydrolase ファミリー136 に属し、構造的にも反応メカニズムも異なっている。以前、我々は LnbX のホモログ遺伝子がヒト成人に生息する一部の腸内細菌およびサル科のビフィズス菌のゲノムに存在していることを見出した。そのうち、成人の腸内細菌 *Tyzzerella nexilis* と *Ruminococcus lactaris,* サル科アカテタマリンの腸内細菌 *Bifidobacterium saguini* の培養菌体に LNBase 活性が検出された。それらホモログ遺伝子のクローニング、異種発現、タンパク質の精製後、結晶化を行った。本報告では、*T. nexilis* と *B. saguini* のホモログについて結晶が得られ、LNB 複合体結晶構造をそれぞれ分解能 1.9Å と 2.3Å で決定した。LnbX との立体構造を比較したところ、*B. longum* 由来の LnbX は Ca^{2+}結合部位が活性中心から離れた位置に存在し構造の安定性に重要なのに対し、他の２種由来のホモログは Ca^{2+}結合部位がないという違いが見られた。

Breastmilk contains human milk oligosaccharides (HMOs) that are comprised of more than 100 individual molecules and stimulate the growth of bifidobacteria in breast-fed infant guts. Among infant-gut associated bifidobacteria, *Bifidobacterium bifidum* and several strains of *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* possess extracellular LNBase to liberate LNB from lacto-*N*-tetraose, one of major components in HMOs. LnbB from *B. bifidum* belongs to GH20, while LnbX from *B. longum* belongs to GH136. Homologous genes of LnbX are distributed among the genome of several members of adult gut microbiota and *Bifidobacterium* sp. isolated from red-handed tamarin. LNBase activity was detected in the anaerobically grown cells of the three bacterial species. We cloned the LnbX homolog genes, heterologously expressed the genes, and purified the proteins. We solved two homologous protein structures of LNB complexes at 1.9 Å and 2.3 Å resolution, respectively. Although LnbX from *B. longum* contains Ca^{2+} ions which are known to be required for efficient protein folding, the two homologs did not contain the metal-binding site.

Glycoside hydrolase, Gut microbiota, Human milk oligosaccharides

発表責任者：山田 千早（achihaya@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2C01-13
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 09:00～ ミーティングルーム C

D-,L-セリンによるセリンラセマーゼの酵素自殺基質反応様修飾の機構

Suicide substrate reaction-like modification of mouse serine racemase with L- and D-Serine

○浜谷 朱梨[1]、伊藤 智和[1]、小川 拓哉[2]、邊見 久[1]、栗原 達夫[2]、吉村 徹[1] ([1]名古屋大院生命農、[2]京都大化学研究所)
○Akari HAMAYA[1], Tomokazu Ito[1], Takuya Ogawa[2], Hisashi Hemmi[1], Tatsuo Kurihara[2], Tohru Yoshimura[1] ([1]Nagoya Univ., [2]Kyoto Univ.)

ピリドキサール 5'-リン酸（PLP）に依存する Fold-type II 型セリンラセマーゼ（SR）は、セリンのラセミ化とともに、L-および D-Ser のデヒドラーゼ反応を触媒する。哺乳動物において SR は、脳内の N-メチル D-アスパラギン酸型レセプターのコアゴニストである D-Ser の生成を担う。以前行った分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* のセリンラセマーゼ（SpSR）の X 線結晶構造解析では、PLP 結合リジンであり L-Ser の α-水素授受の触媒基として機能する Lys57 がリシノ-D-アラニル残基に変換されていることが示された。この結果は、Lys57 が基質との反応中に酵素自殺基質反応様の機構によって修飾されたことを示唆した。また、修飾された SpSR が活性を有したことから、形成されたリジノ-D-アラニル残基が、Lys57 に代って触媒残基として機能すると考えられた。本研究では、マウスの SR（mSR）が同様の修飾を受けるかどうかを検討した。 その結果、mSR は L-Ser との反応によって、モノマーあたり 1 分子の Ser を取り込むこと、またこの修飾により mSR の活性や、分光学的性質が変化することが明らかとなった。

Fold-type II serine racemase (SR) depends on pyridoxal 5'-phosphate (PLP), and catalyzes the dehydration of L- and D-Ser as well as the serine racemization. In mammals, SR is responsible for the production of D-Ser, a coagonist of an *N*-methyl D-aspartate receptor (NMDAR) in their brain. Our previous X-ray crystallography of serine racemase of a fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* (SpSR) demonstrated that Lys57 which is bound with PLP-binding lysine and functions as a catalytic residue for α-hydrogen transfer of L-Ser, was converted to a lysino-D-alanyl residue. The result suggests that Lys57 was modified by a suicide substrate reaction-like mechanism during the reaction with L- and/or D-Ser. The modified SpSR remained active, suggesting that the formed lysino-D-alaninyl residue functions as a catalytic residue in place of Lys57. In this study, we investigated whether mouse SR (mSR) undergoes a similar modification. As a result, one molecule of Ser was incorporated into an enzyme monomer during the reaction with L-Ser. The modification changed the activity and spectroscopic properties of mSR.

D-Serine, Serine racemase, pyridoxal-5'-phosphate

講演番号：2C01-14
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 09:00～ ミーティングルーム C

分裂酵母由来 D-アミノ酸オキシダーゼの安定化に関する研究

Stabilization of D-amino acid oxidase derived from fission yeast

○早河 瑞希、伊藤 智和、邊見 久、吉村 徹（名古屋大生命）
○MIZUKI HAYAKAWA, TOMOKAZU ITO, HISASHI HEMMI, TORU YOSHIMURA (Nagoya Univ.)

D-アミノ酸オキシダーゼ（DAO）は FAD を補酵素とし，様々な D-アミノ酸の酸化的脱アミノ化を触媒するが，その多くは D-アスパラギン酸，D-グルタミン酸といった酸性アミノ酸には作用しない．これに対して，分裂酵母，*Shizosaccharomyces pombe* の DAO（spDAO）はこれら酸性 D-アミノ酸も基質にする．我々はこの特性を生かして，spDAO による系内の全 D-アミノ酸定量法の開発を目指しているが，そのためには D-アミノ酸との反応中に起きる酵素の失活を低減する必要がある．本研究では，*S. pombe* DAO の失活の要因を明らかにし酵素の安定化を図るとともに，実用的な全 D-アミノ酸酵素定量法の開発を目指した．

spDAO はサブユニット当たり 5 個のシステイン残基を有する．カタラーゼを加えて酵素反応を行ったところ失活が抑えられたことから，反応中に見られる spDAO の失活は酵素反応により生成した過酸化水素がシステイン残基を酸化するためである可能性が示唆された．そこで spDAO 中のシステイン残基（C60，C132，C187，C244，C291）の様々な変異体を作製し，活性や安定性を評価した．その結果得られた C60S/C291S/C244L の三重変異体は，野生型酵素と比べて 1.94 倍の活性を有するとともに，反応中に起こる失活の速度が大幅に低下していた．三重変異体の 4℃，還元剤存在下での長期安定性は野生型酵素とほぼ同程度であったが，8 日目の活性は精製直後の野生型酵素の活性の 1.3 倍を維持していた．

Most D-amino acid oxidases （DAO） have little activity on acidic D-amino acids, but the enzyme of fission yeast *Shizosaccharomyces pombe* (spDAO) acts on D-Asp and D-Glu. We aim to develop a method for the determination of total D-amino acids in the system by spDAO by taking advantage of this property. For that purpose we tried to prevent the enzyme from inactivation occurring during the reaction with D-amino acids through the mutation of 5 cysteinyl residues. The obtained triple mutant of C60S/C291S/C244L had 1.94 times more activity than the wild-type enzyme and significantly reduced the inactivation rate during the reaction. The long-term stability at 4 ° C in the presence of a reducing agent was similar to that of the wild-type enzyme, but the activity of the triple mutant on the 8th day maintained 1.3 times the activity of the wild-type enzyme immediately after purification.

D-amino acid oxidase, *Schizosaccharomyces pombe*, Stabilization of enzyme

講演番号：2C01-15
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 09:00～ ミーティングルーム C

プロリン高生産に関与するγ-グルタミルキナーゼ Pro1 変異体の機能解析

Characterization of a novel variant of γ-glutamyl kinase Pro1

○高崎 友里恵、磯貝 章太、豊川 洋一、西村 明、高木 博史（奈良先端大・バイオ）
○Yurie TAKASAKI, Syota ISOGAI, Yoichi TOYOKAWA, Akira NISHIMURA, Hiroshi TAKAGI (Grad.Sch.Sci.Tech.,Naist)

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* において、プロリンはグルタミン酸から還元的に細胞質で合成される。初発酵素である γ-グルタミルキナーゼ Pro1 の活性は、プロリンによってフィードバック阻害を受けるため、細胞内のプロリン含量を制御する鍵酵素である。当研究室では、細胞内プロリンが冷凍やエタノールなどの様々なストレス耐性に関与し、プロリン高含有株は発酵能やエタノール生産性が向上することを報告してきた。このため、プロリン高含有株は発酵化学産業への応用が期待されている。最近、当研究室では泡盛の醸造工程で生成する蒸留粕の有効利用を目的として、泡盛酵母の親株からプロリン高含有変異株を取得した。本研究では、この変異株のプロリン高含有機構を明らかにすることを目的とした。先ず、泡盛酵母の親株と変異株について、細胞内アミノ酸含量を測定した結果、変異株では親株に比べてプロリン含量が約 10 倍に増加していた。そこで、プロリン高含有変異株の PRO1 遺伝子をシークエンスした結果、アミノ酸置換（Gln79His）を伴う新規のヘテロザイガスな変異を見出した。野生型および Q79H 変異型の PRO1 遺伝子を実験室酵母に導入したところ、Q79H 変異型 PRO1 導入株は野生型 PRO1 導入株と比較して細胞内プロリン含量が約 15 倍に増加した。次に、野生型および Q79H 置換型の組換え Pro1 を調製し、プロリンに対するフィードバック阻害感受性を解析した。その結果、野生型 Pro1 では低濃度（1 mM）のプロリンによって活性がほとんど消失した。一方、Q79H 置換型 Pro1 では高濃度（500 mM）のプロリンを添加した条件でも、85%以上の高い残存活性を維持しており、フィードバック阻害がほぼ完全に解除されていることが判明した。さらに、Gln79 を His 以外のアミノ酸残基に置換した変異型 PRO1 遺伝子を実験室酵母に導入したところ、Gln79 を Lys や Arg に置換すると、His 置換体と同様に細胞内プロリン含量が増加した。以上の結果から、Q79H 置換型 Pro1 ではプロリンによるフィードバック阻害が解除されることにより、プロリン高生産に寄与していると考えられた。また、Pro1 の 79 番目残基は正電荷を有するアミノ酸残基に置換した場合に、フィードバック阻害感受性が低下することが示唆された。

Proline is an important amino acid in terms of both biological processes and biotechnological applications. We recently isolated a proline-accumulating yeast mutant carried an allele of the *PRO1* gene encoding the Gln79His variant of Pro1, which is a key enzyme in proline biosynthesis. Interestingly, this novel Pro1 variant was greatly insensitive to feedback inhibition by proline, leading to proline oversynthesis.

γ-glutamyl kinase, proline, *Saccharomyces cerevisiae*

発表責任者：高崎友里恵（takasaki.yurie.tw6@bs.naist.jp）

講演番号：2C01-16
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 09:00～ ミーティングルーム C

耐熱性および熱活性化を示すクチナーゼの性質

Characteristics of cutinase showing thermal stability and heat-activation

○田口 七海、野﨑 功一（信州大院・総合理工）
○Nanami Taguchi, Kouichi Nozaki (Dept. Sci. and Tech. Gra. Sch. Shinshu Univ.)

【目的】糸状菌 *Trichoderma reesei* 由来のクチナーゼ（TrCut）は，クチンおよび各種脂肪酸エステルを加水分解する。その立体構造は他菌由来のクチナーゼに類似しており，N 末端にはリパーゼのような活性部位を覆う疎水性の蓋が存在していることもわかっている [1)]。我々は，TrCut が高い耐熱性を示し，かつ熱処理により活性化する現象を発見したので，その解析結果と考察について報告する。
【方法】*Pichia pastoris* で発現した TrCut を精製し，実験に使用した。クチナーゼ活性は，*p*-nitrophenyl butyrate を基質として pH 7.0 において 40℃で反応させ，400 nm の吸光度増加によって測定した。また，TrCut を熱処理し，氷冷後にその残存活性を測定した。各種添加剤を加えて熱処理することによって耐熱性や活性化の挙動を調査し，そのメカニズムを考察した。
【結果】TrCut の活性は，60℃以上で 10 分間熱処理することによって徐々に増加し，90℃では 40℃で処理した酵素と比較して 4.6 倍に達した。一方，90℃以上の熱処理では活性が徐々に減少し，120℃では 40℃で処理した酵素と同等の値になった。このような高い耐熱性や熱活性化を示すクチナーゼの報告は，本酵素が初めてである。さらに，本酵素を 2-メルカプトエタノール存在下で熱処理した場合には活性の増加は観察されず，未処理の酵素とほぼ同等の値を示した。本酵素には，他菌由来のクチナーゼには存在しない特徴的なジスルフィド結合が存在することがわかっており，これが本酵素の熱に対する挙動に関連していることが予想された。

1) Roussel A et al. J Mol Biol, 426, 3757 (2014)

Cutinase from *Trichoderma reesei* (TrCut) catalyzes the hydrolysis of cutin and various esters containing lipids. TrCut has a hydrophobic lid covering the active site as lipases, and the 3-D structure is similar to the typical cutinases from other sources[1)]. In this study, we report that TrCut showed remarkably high thermal stability and heat-activation.

After treatment at 40-60℃ for 10 min, the activity gradually increased, and reached 4.6-fold higher at 90℃ comparing to that treated at 40℃. The activity decreased gradually at over 90℃ treatment. Heating at 120℃, TrCut showed the same activity treated at 40℃. From the result that the activation was no observed in heating with 2-mercaptoethanol, disulfide bond might be related to the heat-stability and activation.

Cutinase, *Trichoderma reesei*, thermostable enzyme

講演番号：2C01-17
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 09:00～ ミーティングルーム C

微生物ホスホリパーゼ D の反応機構解析

Reaction mechanism analysis of microbial phospholipase D

○岩元 遥香、後藤 友彰、DAMNJANOVIC Jasmina、中野 秀雄、岩崎 雄吾 (名大農)
○ Haruka IWAMOTO, Tomoaki GOTO, Jasmina DAMNJANOVIC, Hideo NAKANO, Yugo IWASAKI (Nagoya Univ.)

【目的】ホスホリパーゼ D(PLD)は、リン脂質の加水分解反応と極性基の転移反応を触媒する。本酵素の反応機構は、N 末端側ハーフドメインの His168 残基を求核触媒(Nu)、C 末端側ハーフドメインの His442 残基を一般酸・塩基触媒(GA/GB)とした、ピンポン機構であると考えられている。しかし、2 つの His 残基や周囲のアミノ酸残基はほぼ対称な空間配置をとっており、なぜ一方が Nu、他方が GA/GB として役割分担できるのかは疑問である。また、この反応機構では分子内環化による環状ホスファチジン酸生成を説明できないという矛盾がある。本研究では、H168 と H442 はどちらも Nu として作用できるのではないかとの仮説を検証することで、本酵素の反応機構を解明することを目的とした。
【方法と結果】 2 つの His 残基の一方を置換した変異酵素、H168R、H168A、H442R および H442A を調製し、酵素活性を調べたところ、一方の His 残基を失っても、微量ではあるが酵素活性を示すことがわかった。次に、変異 PLD をホスファチジルコリンに作用させ、反応途上で失活後、プロテイナーゼ K により完全分解した。その分解物を LC-MS で分析したところ、共有結合性の酵素-基質中間体に由来するホスファチジル-ヒスチジンに相当する m/z=836 のピークを検出した。このピークの溶出時間は化学合成したホスファチジル-ヒスチジン標品のそれと一致し、全ての変異型 PLD において検出された。この結果は、どちらの His 残基も Nu として作用できるという仮説を支持するものである。

<Objectives> Phospholipase D (PLD) catalyzes phospholipid hydrolysis and polar group exchange. The reaction mechanism of this enzyme is thought to be a ping-pong mechanism, with His168 as a nucleophilic catalyst (Nu)and His442 residue as a general acid/base catalyst (GA/GB). However, the two His residues and the surrounding amino acid residues have an almost symmetrical spatial arrangement, and it is questionable how one can share the role as the Nu and the other as the GA/GB. In addition, the mechanism with H168 as the Nu and H442 as the GA/GB does not explain cPA formation by intramolecular cyclization. In this study, we aimed to elucidate the reaction mechanism of this enzyme by testing the hypothesis that both H168 and H442 could act as the Nu.
<Results> Four mutants PLDs, H168R, H168A, H442R, and H442A, which lack one of the two His residues showed small enzymatic activities despite the lack of one His residue. Then, the mutant enzymes were treated with phosphatidylcholine for a short period, inactivated during the reaction, and followed by degradation with Proteinase K. LC-MS analysis of the digested sample detected a peak corresponding to phosphatidyl-Histidine, which was derived from the covalent enzyme-substrate intermediate. This result supports the hypothesis that both His residues can act as the Nu.

phospholipase D, catalytic mechanism

発表責任者：岩元遥香（iwamoto.haruka@molbiotech-nagoya.org）

講演番号：2C03-01
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 10:00～ ミーティングルーム C

ビフィズス菌由来新規 exo-α-D-fructofuranosidase の機構解析用フラノシド誘導体の合成研究

Synthetic study on furanoside derivatives for the bifidobacterial exo-α-D-fructofuranosidase

○石渡 明弘[1]、鹿島 騰真[2]、藤田 清貴[3]、伏信 進矢[2,4]、伊藤 幸成[1,5]([1]理研開拓研究本部、[2]東大院農生科、[3]鹿大院農、[4]東大微生物連携機構、[5]阪大院理)
○Akihiro ISHIWATA[1], Toma KASHIMA[2], Kiyotaka FUJITA[3], Shinya FUSHINOBU[2,4], Yukishige ITO[1,5] ([1]RIKEN CPR, [2]Grad. Sch. Agr. Life Sci, Univ. Tokyo, [3]Fac. Agr., Kagoshima Univ., [4]CRIIM, Univ. Tokyo, [5]Grad. Sch. Sci., Osaka Univ.)

結核菌などの抗酸菌の細胞壁成分のアラビナン鎖を分解する D-arabinofuranosidase 類[1]の機能解析のためのプローブ類の合成を進めている[2]。*Bifidobacterium dentium* 由来の機能未知ドメインを含む酵素群の中から exo-α-D-arabinofuranosidase の相同タンパク質が見出され、すでに結晶構造解析もすすめられている[3]。食品に含まれる類似構造の α-D-フルクトフラノシドが分解されることも同時に見出されたが、より詳細な機能解析のために、α-D-アラビノ- および、α-D-フルクト-フラノシド誘導体の合成研究を行なった。

今回、基質プローブとして PNP α-D-アラビノ- および、α-D-フルクト-フラノシドや阻害剤プローブとして α-チオフラノシド類を、従来法に従い合成した。フルクトフラノシド基質プローブは、分解酵素の非存在下において不安定であるという知見が得られた。これは、フルクトフラノシドのアノマー炭素にアラビノースには無い求核的なヒドロキシメチル基が置換しているためであると考えており、分子内で影響を及ぼすと推測している。基質として、D-アラビノフラノシド誘導体を用いた NMR による機構解析についても併せて報告する。

The synthesis of probes for the functional analysis of D-arabinofuranosidases (Ara*f*ase)[1] that degrade the cell wall arabinan from acid-fast bacilli such as Mycobacteria has been carried out.[2] The homologue of exo-α-D-Ara*f*ase was identified in the enzymes containing unknown function domain from *Bifidobacterium dentium*, so X-ray analysis of the homologue was reported very recently.[3] By the action of the enzyme it was also found to hydrolyze α-D-fructofuranosides (Fru*f*) contained in food. For a detailed analysis of the enzymes, synthetic studies on the α-D-Ara*f* and α-D-Fru*f* probes has been carried out.

Their probes as the substrate and the inhibitor (PNP α-D-Ara*f* and α-D-Fru*f*, and α-1-thio derivatives) were synthesized according to the conventional method. It was found that the Fru*f* substrate probe is unstable even in the absence of degrading enzymes. The intramolecular effect of nucleophilic hydroxymethyl group substituted at the anomeric carbon in Fru*f* structure may result in non-enzymatic hydrolysis. NMR analysis of enzymatic hydrolysis using D-Ara*f* derivative instead of Fru*f* one will be reported for understanding mechanism of action.

References; 1) a. Kotani, S. et al., *Biken J.* **1971**, *14*, 379; b. Bhamidi, S. et al. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 12992. 2) a. Ishiwata, A.; Ito, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 2275; b. Kaeothip, S., et al., *Carbohydr. Res.* **2013**, *382*, 95. 3) a. Kashima, T. et al, A*bstracts of Papers, Int. Symp. Bifidobacterium Res.*, **2020**; b. Fujita K.; Ishiwata, A., *Jp Patent Appl.* 2020-055336.

Furanoside, Stereoselective Synthesis, Glycosyl hydrorase

発表責任者：石渡　明弘（aishiwa@riken.jp）

講演番号：2C03-02
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 10:00～ ミーティングルーム C

ガラクトヘプトースを用いた KRN7000 類縁体の設計と合成

Design and synthesis of KRN7000 using natural galacto-heptose

○渡邊 健吾、髙澤 早希、西田 芳弘、土肥 博史（千葉大院園芸）
○Kengo WATANABE, Saki TAKASAWA, Yoshihiro NISHIDA, Hirofumi DOHI (Chiba Univ.)

KRN7000 は α-GalCer 構造を有しており、NKT 細胞を強力に活性化し多量のサイトカインを産生誘導する。しかし、免疫賦活活性を誘導する Th1 型と免疫抑制活性を誘導する Th2 型サイトカインが同時に産生誘導されてしまうため治療薬への応用は制限されている。我々は新たな KRN7000 類縁体として、微生物の外膜に存在する天然の七炭糖であるガラクトヘプトースを糖骨格にもつ化合物を設計し、これを化学合成してサイトカイン産生誘導活性を評価することを目的とした。

2,3 位をベンジル基、4 位を PMB 基で保護した methyl α-D-galactopyranoside に対して SO_3·Py-Et_3N-DMSO を用いた酸化反応[ref]および Wittg 反応を施してアルケンに変換した。続いて、アルケンに対してオスミウム酸化を行いガラクトヘプトース型七単糖をジアステレオ混合物（d.r.=4.4/1）として得た。これらの混合物を単離して 4 位の PMB 基と 6 位の水酸基をそれぞれ酸化的に環化した後、NOE スペクトルにより C-6 の絶対配置を決定し、主生成物が D-*glycero* 型であることがわかった。得られた D-*glycero*-ガラクトヘプトース誘導体をイミデート型糖供与体へと変換した後、別途調製したフィトスフィンゴシン型糖受容体とグリコシル化を行い糖脂質骨格を得た。最後に、脂肪酸鎖の導入および脱保護反応を施して D-*glycero*-ガラクトヘプトースを有する KRN7000 類縁体の合成に成功した。

KRN7000 has α-GalCer structure and strongly induces both Th1 and Th2 cytokines at the same time, which limits its application for therapeutic agents. In this study, we designed natural galacto-heptose based glycolipids as KRN7000 analogue and synthesized them by stereoselective dihydroxylation. After oxidation of 6-OH of methyl 2,3-di-*O*-benzyl-4-*O*-PMB-α-D-galactopyranoside by treatment with SO_3·Py-Et_3N-DMSO [ref], the aldehyde was subjected to Wittig reaction to give homologated alkene. The alkene was dihydroxylated by OsO_4 to give galactoheptose derivatives as a diastereo mixture (d.r. = 4.4 / 1). After isolation of diastereomers, 4-PMB and 6-OH of each diastereomer was cyclized by DDQ oxidation using DDQ and the configuration of C-6 was determined by NOE spectrum, respectively. Obtained D-*glycero*- galactopyranoside was converted into glycosyl imidate, which was coupled with phytosphingosine derivative to afford glycolipid structure. Finally, introduction of lipid moiety and global deprotection of the glycolipid derivative afforded KRN7000 using natural galactoheptose.

Reference: Hauser, F. M., Hewawasam, P., Mal, D. J. Am. Chem. Soc. 1988, 110, 2919-2924.

glycosylation, chemical synthesis, glycolipid

発表責任者：土肥　博史（hdohi@faculty.chiba-u.jp）

講演番号：2C03-03
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 10:00～ ミーティングルーム C

Haemophilus 属 LPS のコア糖鎖の合成研究

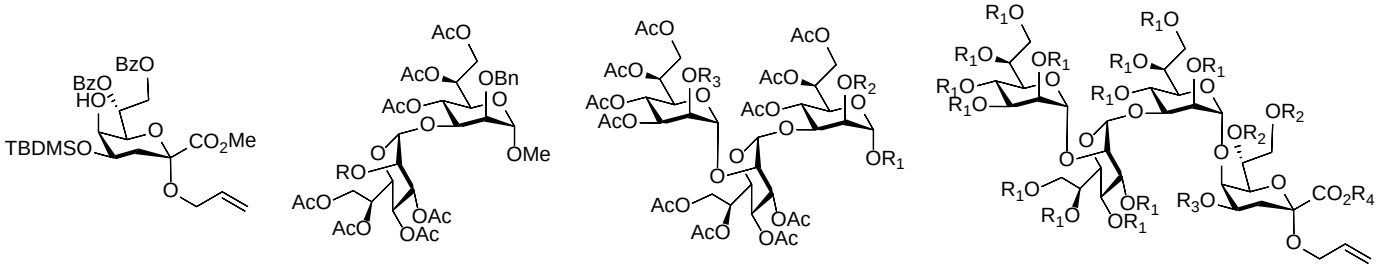
Synthesis of core saccharides of *Haemophilus* LPS

○尾川 周平[1]、服部 朝渚[2]、一柳 剛[2] ([1]鳥取大院持続性社会、[2]鳥取大農)
○Shuhei OGAWA[1], ASANA HATTORI[2], TSUYOSHI ICHIYANAGI[2] ([1]Grad. Sch. Tottori Univ., [2]Tottori Univ.)

グラム陰性菌は細胞外膜に複合糖脂質、リポ多糖（LPS）を産生する。主に 3-Deoxy-D-*manno*-oct-2-ulosonic acid (Kdo), L-*glycero*-D-*manno*heptose (Hep)で構成されている。我々は, LPS のコア糖鎖の生物学的機能を調査するため, コア糖鎖の効率的な合成法の確立と糖鎖ライブラリ構築に取り組んでいる。これまでに連続分岐構造を有する *Neisseria* 属 LOS のコア 2～7 糖合成を達成している。本研究では 2-ナフチルメチル基(NAP)を有する Hep 誘導体を使用し, ベンジル基存在下における選択的脱保護により、*Haemophilus* 属 LPS の直鎖コア 4 糖の合成を試みた。

まず, 4 位にシリル保護基を有する Kdo 受容体 **1** の 5 位へ Hep 単糖供与体を導入した。その結果, 嵩高い *t*-ブチルジメチルシリル保護基が存在しても α 立体選択的に2糖を合成可能であることを確認した。

続いて Hep 3 糖の合成を行った。Hep(α1-3)Hep 誘導体 **2** の NAP 基を DDQ で処理することで官能基選択的に除去した（91%）。得られた二糖誘導体 **3** の 2 位に Hep 誘導体を導入し Hep(α1-2)Hep(α1-3)Hep 誘導体 **4** を 91%で得た。3 糖の脱保護は DDQ 酸化, 水素化分解, 最後にアルカリ加水分解で達成した。最後に 3 糖供与体 **5** と Kdo 受容体 **1** とのグリコシル化を行い *Haemophilus* 属 LPS のコア 4 糖の骨格合成を達成した。これらの詳細と最終脱保護の結果も併せて報告する。



1

2: R=NAP
3: R=H

4: R_1=Me, R_2=Bn, R_3=NAP
5: R_1=C(NH)CCl_3, R_2=Ac, R_3=Ac

6: R_1=Ac, R_2=Bz, R_3=TBDMS, R_4=Me
7: R_1, R_2, R_3=H, R_4=Na

Core di-, tri and tetrasaccharides of *Haemophilus* LPS were successively synthesized by using 2-*O*-(2-naphtylmentyl) protected heptose derivative as a building block. Glycosylation of the 4-*O*-TBDMS protected Kdo acceptor with heptose, heptobiose, and heptotoriose donors gave corresponding oligosaccharides in moderate to good yield with complete stereoselectivity.

LPS, L-*glycero*-D-*manno*heptose, 3-Deoxy-D-*manno*-oct-2-ulosonic acid

講演番号：2C03-04
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 10:00～ ミーティングルーム C

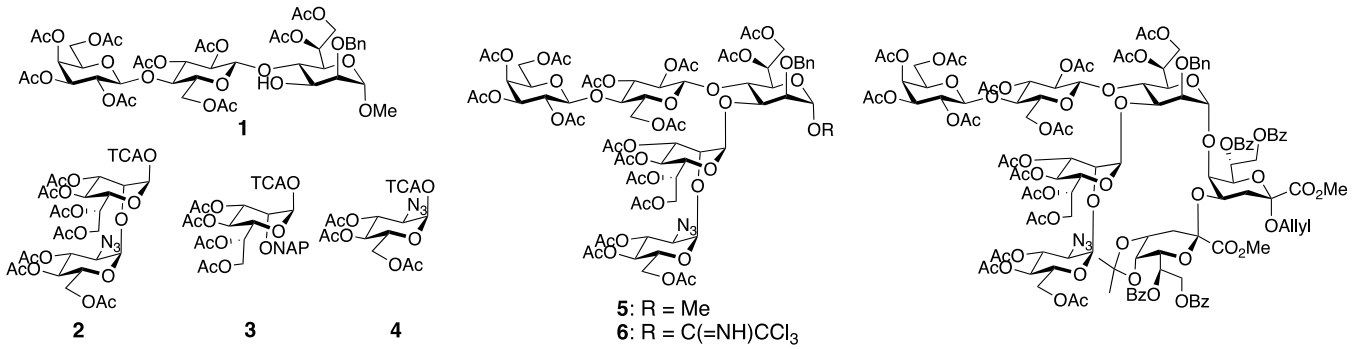
Neisseria 属細菌が産生するリポオリゴ糖の内部コア 7 糖の合成研究

Synthetic study of the core heptasaccharide expressed in Neisserial lipooligosaccharides

○一柳 剛[1]、大谷 直輝[2]、尾川 周平[2] ([1]鳥取大農、[2]鳥取大院持続性社会)
○Tsuyoshi ICHIYANAGI[1], Naoki OHTANI[2], Shuhei OGWAWA[2] ([1]Tottori Univ., [2]Grad. Sci. Tottori Univ.)

Neisseria 属細菌が産生するリポオリゴ糖（LOS）のコア糖鎖は 3-Deoxy-D-*manno*-oct-2-ulosonic acid（Kdo），L-*glycero*-D-*manno*-heptose（Hep），グルコサミンからなり，Kdo の 4,5 位および Hep の 3,4 位で分岐した連続分岐構造を有している。我々は，このような連続した隣接ジオール分岐構造をもつ糖鎖構築に取り組んでいる。今回，Neisseria 属 LOS の内部コア7糖の合成経路の最適化に取り組み，骨格合成に成功したので報告する。7 糖の合成は，Kdo2糖ユニットと中性5糖ユニットを縮合することで 4,5-分岐 Kdo 骨格を構築することとした。3,4 分岐 Hep 構造は 4 位にラクトースを導入した Hep の 3 位に GlcN(α1-3)Hep ユニットを導入する[3+2]経路，および逐次伸長する[3+1+1]経路の 2 種類を検討し比較することとした。

まず受容体 **1** の 3 位水酸基への $GlcN_3$(α 1→2)Hep 二糖供与体 **2** によるグリコシル化を行ったところ，対応する 5 糖 **5** を収率 71%, α/β=1.0/1.4 で得ることできた。次に逐次合成を試みた。受容体 **1** に Hep 誘導体 **3** の導入を試みた結果，α体を優先して良好な収率で得ることができた。続いて 2 位に NAP 基を選択的に脱保護したのち，グルコサミン誘導体 **4** を導入することで Neisseria 属 LOS の中性コア五糖 **5** を合成した。最後に，合成した五糖供与体 **6** と Kdo 二糖ユニットとの縮合を行い，Neisseria 属 LOS のコア七糖を収率 22%でα選択的に得ることに成功した。本合成は隣接分岐構造が連続した LOS 関連糖鎖の初めての合成例となる。これらの結果より，cis 配座である 4,5 分岐 Kdo 構築は糖鎖の大きさにかかわらず構築が容易であることが分かった。一方，3,4 位が trans 配座である Hep の分岐構築では，供与体の種類により収率と立体選択性が変化することが分かった。



A core heptasaccharide derivative expressed in Neisserial LOS was successfully synthesized. In this study, we found that the construction of 4,5-branched Kdo structure was not difficult regardless of the size of the donors, while the construction of 3,4-branched Hep structure was difficult due to changes in reactivity and selectivity depending on the type of donors.

lipooligosaccharide, 3-deoxy-D-manno-oct-2-ulosonic acid, L-glycero-D-manno-heptose

発表責任者：一柳剛（yanagi@tottori-u.ac.jp）

講演番号：2C03-05
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 10:00～ ミーティングルーム C

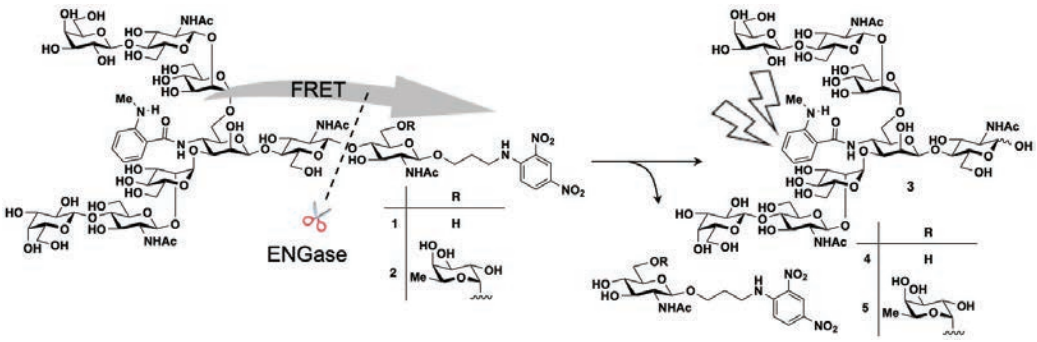
コアフコース含有 2 分岐複合型糖鎖 10 糖プローブの合成

Synthesis of a fucosylated complex type decasaccharide derivative

○石井 希実、永田 光穂、髙垣 智迪、高橋 諭、江橋 竜史、佐藤 樹、松尾 一郎（群馬大院理工）
○Nozomi ISHII, Mitsuo NAGATA, Tomomichi TAKAGAKI, Satoshi TAKAHASHI, Ryuji EBASHI, Itsuki SATO, Ichiro MATSUO (Gunma Univ.)

エンド-β-*N*-アセチルグルコサミニザーゼ（ENGase）は糖タンパク質上のアスパラギン結合型糖鎖を切り出す糖加水分解酵素であり、糖タンパク質糖鎖の構造解析研究に利用されている。

これまでに我々は ENGase の活性を簡便に検出することを目的として、蛍光検出により反応の追跡が可能な FRET(Förster resonance energy transfer)消光の原理を利用した蛍光糖鎖分子プローブの合成を報告してきた[1,2]。また、コアフコースを認識する ENGase に対する糖鎖プローブとしてコアフコースを有する 6 糖プローブを合成した。そして、Endo-F3 を用いて活性検出を試みたところ、Endo-F3 の活性は検出できたものの、プローブの切断効率が十分ではなかった。そこで、酵素による認識を高めるために糖鎖構造を拡張したコアフコース含有 2 分岐複合型糖鎖 10 糖プローブの合成を行った。本発表では、10 糖プローブの合成と ENGase による加水分解反応の結果について報告する。



Endo-β-*N*-acetylglucosaminidases (ENGases) is used for enzymatic glycan analysis of oligosaccharide on glycoprotein due to their hydrolytic activity. To easily evaluate ENGase activity, we developed FRET (Förster resonance energy transfer) based assay system [1,2]. In the previous study, a fucosylated hexasaccharide probe was synthesized, which was hydrolyzed by fucose-containing oligosaccharides-specific ENGase (Endo-F3).

To explore the relationship between the glycan structure and ENGase activity, a fucosylated complex type decasaccharide derivative was designed. In this session, we will present the synthesis of the decasaccharide derivative and the hydrolysis of the synthesized glycan probe.

[1] N. Ishii, C. Sunaga, K. Sano, C. Huang, K. Iino, Y. Matsuzaki, T. Suzuki, and I. Matsuo, *ChemBioChem*, **2018**, *19(7)*, 660-663.

[2] N Ishii, Kanae Sano, and Ichiro Matsuo, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2019**, *29(13)*, 1643-1646.

endo-β-N-acetylglucosaminidase (ENGase), fucosylated complex type glycan, enzyme assay

発表責任者：石井希実（nozomiishii@gunma-u.ac.jp）

講演番号：2C03-06
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 10:00～ ミーティングルーム C

ポリガラクツロナーゼ阻害タンパク質の発現、精製、阻害活性について

On the expression, purification, and inhibitory activity of polygalacturonase inhibitor proteins

○山本 和樹[1]、倉田 淳志[2]、上垣 浩一[2] ([1]近大院農、[2]近大農)
○Kazuki YAMAMOTO[1], Atsushi KURATA[2], Koichi UEGAKI[2] ([1]Grad.sch.Kindai Univ., [2]Kindai Univ.)

【目的】ポリガラクツロナーゼ阻害タンパク質(PGIP)は細菌などが産生するポリガラクツロナーゼ(PG)を阻害する植物防御タンパク質である。PGIP は特徴的なアミノ酸配列モチーフ(ロイシンリッチリーピト)を有すが、PGIP は由来する植物ごとに阻害する微生物の PG は異なり、阻害様式の多様性が示唆されている。しかし、構造学的にはよく分かっていない。よって、PGIP の阻害様式と構造の関係を明らかにすることを目標に、オレンジとシロイヌナズナの PGIP 発現系の構築・精製、組換え PGIP の PG に対する阻害活性を測定したので報告する。
【方法】pET32 発現系に PGIP の遺伝子を組み込みチオレドキシン融合タンパク質として発現させたが、両 PGIP は共に封入体を形成した。まず Urea などの変性剤で封入体を可溶化させ、ヒスタグキレートカラム・陰イオンクロマトグラフィーで組換え PGIP の精製を行った。PGIP のリフォールディングは透析により変性剤を除去することで行った。この時、透析した画分の上澄みに残っているタンパク質量を目安に、緩衝液の種類、pH、塩強度等の検討を行った。また PGIP の PG 阻害活性は PG の反応に伴い遊離されるガラクトースの還元末端基を定量することで行った。
【結果】リフォールディング条件の検討の結果、グルコース等を含む Tris Buffer で最大の可溶化タンパク質回収率（90%）を得る事ができた。また阻害活性測定から、オレンジとシロイヌナズナの PGIP における PG の阻害に差がある事が分かった。

【Purpose】Polygalacturonase inhibitor protein (PGIP) is a plant defense protein that inhibits various polygalacturonase (PGs) produced by bacteria. Suggested a diversity of inhibition modes, but their structures aren’t well understood. Therefore, to elucidate the relationship between PGIP inhibition mode and structure, we constructed the pET expression systems of *Citrus* and *Arabidopsis* PGIP and the inhibitory activity of purified recombinant PGIP was a PG activity.
【Methods】PGIPs were expressed as a thioredoxin fusion form, both PGIPs formed inclusion bodies. These were solubilized with denaturant and then purified by His-tag chromatography. Based on the amount of solubilized protein of the dialysis fraction, we examined the type of buffer, pH and salt strength. The PG inhibitory activity of PGIP was determined by quantifying the reduced end group of galactose released by PG.
【Results】The maximum solubilized protein recovery (90%) was obtained with Tris Buffer containing glucose, etc. The inhibition activity of PG in the PGIP of *Citrus* and *Arabidopsis* was different.

Polygalacturonase inhibitor protein (PGIP), Expression systems, Refolding

発表責任者：上垣浩一（k-uegaki@nara.kindai.ac.jp）

講演番号：2C03-07
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 10:00～ ミーティングルーム C

サンゴ由来（*Acropora milepopa*）レクチン様タンパク質の機能解析

Function analyses of the lectin like protein from the coral *Acropora millepora*

○古賀 萌子[1]、上村 亮介[1]、外山 諒[1]、海野 英昭[1]、畠山 智充[1]、郷田 秀一郎[1,2]([1]長崎大工、[2]創価大理工)
○ Moeko KOGA[1], Ryosuke KAMIMURA[1], Ryo TOYAMA[1], Hideaki UNNO[1], Tomomitsu HATAKEYAMA[1], Shuichiro GODA[1,2] ([1]Nagasaki Univ., [2]Soka Univ.)

サンゴの一種であるハイマツミドリイシ(*Acropora millepora*)の発生過程において発現レベルに変化が見られる遺伝子として AML36 及び AML49 が報告されている。この遺伝子がコードするタンパク質は、ナマコの一種であるグミ(*Cucumaria echinata*)由来溶血性レクチン CEL-III にアミノ酸配列相同性を示す。CEL-III は、ガラクトース/N-アセチルガラクトサミン特異的でヒト・ウサギ赤血球に対し溶血活性を示す。そこで大腸菌を宿主に用いて AML36 及び 49 を生産し、その機能解析を行った。AML36, 49 を His-tag 融合タンパク質として生産させところ、封入体として得られたため、塩酸グアニジンによる可溶化と、希釈による変性剤濃度の低下による巻き戻しを行った。巻き戻し後の AML36, 49 は Ni-NTA Affinity Chromatography によって精製した。得られたタンパク質をウサギ由来赤血球と混合させたところ、AML36 では赤血球凝集活性が確認され AML49 では赤血球凝集溶血活性は確認されなかった。AML36, 49 は CEL-III にアミノ酸配列相同性を示すが、タンパク質の C 末端側で延長が見られることから、それらを切除した変異体を作成した。その結果、C 末端を切除した AML36 変異体は、赤血球溶血活性を示した。これらのことから、C 末端部分が AML の機能に大きく影響を与えていると考えられた。

Changes in gene expression of the two genes while development, AML36 and 49, from coral, *Acropora millepora* have been reported. These genes showed high similarity to the gene of CEL-III, hemolytic lectin from sea cucumber, *Cucumaria echinata*. CEL-III shows hemolytic activity for human and rabbit erythrocyte and carbohydrate specificity for galactose and GalNAc. Function analysis was done for products of these two genes. AML36 and 49 proteins were produced as recombinant protein and *Escherichia coli* as a host. Both AML36 and 49 were produced as inclusion body, refolding was done after solubilization by 6 M GuHCl. AML36 protein showed hemagglutinating activity for rabbit erythrocyte and AML49 showed no activity. The result of amino acid sequence homology search showed that the elongation of the amino acid sequences was seen in C-terminus of the AML36 and 49 genes compare to the amino acid sequence of CEL-III. Therefore, mutant with shorten C-terminus amino acid of AML36 was made. The mutant showed hemolytic activity for rabbit erythrocyte. This result suggested that the elongated sequence at C-terminus affect the hemagglutinating/hemolytic activity.

lectin, pore forming toxin, coral

講演番号：2C03-08
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 10:00～ ミーティングルーム C

醤油乳酸菌 *Tetragenococcus halophilus* 由来 Aspartate:Alanine 交換輸送体（AspT）の複合体構造
Oligomeric structure of Aspartate:Alanine transporter (AspT) from *Tetragenococcus halophilus*
○山中 空、宮本 あかり、國井 宏太、七谷 圭、阿部 敬悦（東北大農）
○TAKASHI YAMANAKA, AKARI MIYAMOTO, KOUTA KUNII, KEI NANATANI, KEIETSU ABE (Tohoku Univ.)

【研究背景・目的】微生物を利用した有用物質生産は産業的に不可欠な技術である。従来方法である細胞内代謝系の改変だけでは、基質や生産物の輸送が律速となり効率的な物質生産の障害となる。そこで我々は物質輸送を司る輸送体の機能を改良し、産業応用に向けた研究を進めている。本研究では、乳酸菌 *Tetragenococcus halophilus* 由来 Aspartate：Alanine 交換輸送体 AspT に着目した。AspT は産業上有用な輸送体が多い Aspartate：Alanine Exchange (AAEx)-Family に属し、将来的に同 Family に属するコハク酸排出輸送体[3]等への応用が可能になれば、食品や医薬品等の生産性向上にも貢献できると期待される。そのため我々は AspT の基質輸送機能の強化に向けて、これまでの酵素学的知見と合わせ[1), 2)]、原子レベルでの基質輸送メカニズムの解明を目指している。本研究では、界面活性剤 n-Dodecyl-β-D-maltopyranoside (DDM) による可溶化状態の AspT 複合体状態の解析を試みた。
【方法・結果】*Escherichia coli* C43 (DE3) 株を発現宿主とし、IPTG 添加による AspT 発現誘導と DDM 可溶化 His-tag 精製により、精製 AspT を取得した。はじめに DDM 可溶化状態の AspT の絶対分子量を Size-Exclusion Chromatography-Multi Angle Light Scattering (SEC-MALS) によって計測した。精製 AspT の分子量は 128 kDa と算出され、アミノ酸配列による推定 AspT 分子量は 58.0 kDa である事から、DDM 可溶化状態の AspT は二量体を形成していると示唆された。次に、BlueNative PAGE 解析の結果、SEC-MALS と同様に DDM 可溶化 AspT は二量体を形成していることが示された。また、変異体 AspT L60C は非還元条件でジスルフィド結合による二量体が形成される[2)]。そこで、精製 AspT L60C, AspT WT を GPC に供して溶出位置を比較した結果、どちらも 11 mL 付近にピークが検出された。以上の結果から DDM 可溶化状態の AspT は二量体を形成することを強く示唆された。

We focused on the Aspartate:Alanine transporter (AspT) which was originally found in the lactic acid bacterium *Tetragenococcus halophilus*. AspT belongs to the Aspartate:Alanine Exchange (AAEx) Family transporters. In this study, in order to elucidate the oligomeric structure of AspT in the solubilized state, we demonstrated SEC-MALS, BlueNative PAGE, and GPC. From these results, the AspT was suggested to form dimer.

【参考文献】1) Nanatani K., Abe K. *et al*., *J. Bacteriol.* 2007; **189**: 7089-7097.2) Nanatani K., Abe K. *et al*., *J. Bacteriol.* 2009; **191**: 2122-2132.3) Fukui K., Abe K. *et al*., *J. Bacteriol.* 2011; **154**: 25-34.

Transporter, Oligomeric structure

発表責任者：阿部敬悦（keietsu.abe.b5@tohoku.ac.jp）

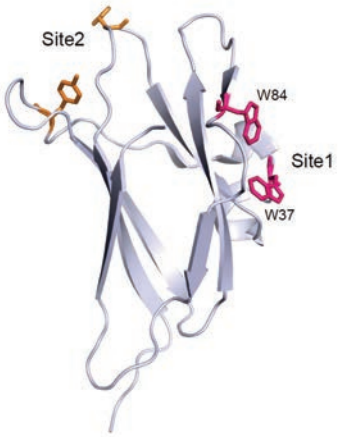
講演番号：2C03-09
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 10:00～ ミーティングルーム C

分子表面の芳香族アミノ酸クラスターがグルコアミラーゼのデンプン結合ドメインの構造安定性とアンフォールディングにおよぼす影響

Effects of surface-exposed aromatic cluster in the starch-binding domain of glucoamylase on structural stability and unfolding

○福富 瑚乃、鈴木 一史、杉本 華幸（新潟大院　自然科学）
○Kono FUKUDOMI, Kazushi SUZUKI, Hayuki SUGIMOTO (Graduate School of Sci. and Tech., Niigata Univ.)

黒コウジカビグルコアミラーゼのデンプン結合ドメイン（SBD）には，2 つのデンプン結合部位（Site1，Site2）があり，各結合部位には芳香族アミノ酸残基が存在する。Site1 には 2 つの Trp 残基（W37，W84）があり，これらの側鎖は分子表面に位置している（右図）。SBD は分子表面に大きな芳香族アミノ酸クラスターが存在するユニークな構造を有する。本研究では，この芳香族アミノ酸クラスターが SBD の構造安定性と構造形成におよぼす影響を明らかにすることを試みた。



野生型および 2 種の変異型，W37L と W84L の変性剤変性反応について平衡論的解析を行ったところ，変性のギブズエネルギー変化［$\Delta G^0_{(H2O)}$］は，それぞれ 27，7，16 kJ mol^{-1} であった（pH 7.0，25℃）。W84 に比べて W37 を欠損させた方が，不安定化効果が大きいことがわかった。アンフォールディング反応の速度論的解析を行ったところ，見かけの速度定数は，野生型，W37L，W84L においてそれぞれ，0.00081，0.14，0.017 s^{-1} であった（pH 7.0，25℃，8 M 尿素共存下）。いずれの変異型も野生型よりアンフォールディング速度が速くなったが，その影響は W37 の欠損の方が大きかった。これらの結果から，分子表面の芳香族アミノ酸クラスターを形成する 2 つの Trp 残基のうち，W37 の方が W84 よりも SBD の構造安定性やアンフォールディングにおよぼす影響が大きいことがわかった。これは，W37 が W84 よりも多くのアミノ酸残基と相互作用を形成していることに起因すると考えられた。

The starch-binding domain (SBD) of *Aspergillus niger* glucoamylase has two ligand binding sites, Site1 and Site2. Two Trp residues at Site1 (W37 and W84) are located at molecular surface. We attempted to examine effects of the surface-exposed aromatic cluster on the structural stability and unfolding reaction of SBD. Removal of W37 and W84 leaded to structural destabilization and to acceleration in the unfolding rate. The effects of the substitution at W37 were significantly larger than those at W84. This may result from the difference in number of interactions formed in the vicinity of each Trp residue.

starch-binding domain, aromatic cluster, unfolding

発表責任者：杉本華幸（hayuki@agr.niigata-u.ac.jp）

講演番号：2C03-10
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 10:00～ ミーティングルーム C

単細胞性シアノバクテリア由来フマラーゼの生化学的解析

Biochemical properties analysis of fumarase C from a unicellular cyanobacterium.

○片山 徳賢[1]、小山内 崇[2] ([1]明治大院農、[2]明治大農)
○Noriaki KATAYAMA[1], Takashi OSANAI[2] ([1]Meiji Univ. Grad. Sch., [2]Meiji Univ.)

米国エネルギー省が定めるバイオリファイナリーでの重要な 12 品目にはコハク酸やフマル酸、リンゴ酸という C_4 化合物が含まれる。これらは細胞内の代謝産物の重要な中間体であり、食品添加物としての利用や医薬製剤の前駆体、化学工業製品の基幹物質として知られている。フマラーゼ(FumC)は、TCA 回路内のリンゴ酸とフマル酸の相互変換反応を触媒する酵素である。フマラーゼは多くの生物で生化学解析が行われているが、モデルシアノバクテリアである *Synechocystis* sp. PCC 6803 のフマラーゼ（以後 *Sy*FumC と表記）の生化学的特徴については報告がない。そこで本研究では、*Sy*FumC の生化学解析とアミノ酸残基の改変による機能改変を試みた。

GST タグを付加した *Sy*FumC を *Escherichia coli* を用いて発現させ、アフィニティークロマトグラフィーによって *Sy*FumC の精製を行った。分光光度計を用いて、フマル酸の波長 250 nm における吸収の減少及び増加を測定することで、フマル酸または L-リンゴ酸を基質とする酵素活性を測定した。*Sy*FumC の生化学解析から至適温度及び至適 pH は 30℃、pH 7.5 であるとわかった。また、フマル酸及び L-リンゴ酸に対する K_m 値は、それぞれ 0.24 mM、0.48 mM となり、L-リンゴ酸に対する基質親和性がフマル酸と比べて低いということが分かった。また、k_{cat}/K_m 値は、それぞれ 415.1、90.3 s^{-1} mM^{-1} となった。更に、他のシアノバクテリアとの FumC のアミノ酸配列の比較から変異を導入したタンパク質では、基質に対する k_{cat} 値が大きく低下した。

以上より、今回改変した活性部位近傍のアミノ酸残基は触媒活性に重要な残基であると考察される。

C_4 compounds such as succinate, fumarate, and malate are important intermediates of central carbon metabolism and are known as basic substances for use as food additives, pharmaceutical preparations, and chemical industrial products. Fumarase is an enzyme that catalyzes the reversible conversion of fumarate and L-malate in TCA cycle. However, the biochemical properties of fumarases have been studied in many organisms, they have not been investigated in cyanobacteria. We here investigated fumarase of *Synechocystis* sp. PCC 6803 (hereafter *Sy*FumC). The K_m values of *Sy*FumC for fumarate and L-malate were 0.24 mM and 0.48 mM, respectively, indicating that the substrate affinity for L-malate was lower than that for fumarate. Compared the amino acid sequence of FumC with other cyanobacteria and organisms, the characteristic amino acid residues in the vicinity of the active site were determined, and we obtained *Sy*FumC_A314E substituting glutamate for alanine at position 314, was prepared, and the enzyme activity was similarly measured. Based on the above, the amino acid residues near the active site modified this time are considered to be important residues for catalytic activity.

Synechocystis, TCAcycle, Enzyme

講演番号：2C03-11
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 10:00～ ミーティングルーム C

簡便な DNA 抽出法開発に向けたイミダゾリウム修飾担体の構築と吸着溶出性能の基礎評価

Preparation and evaluation of imidazolium-modified support for the development of facile DNA extraction methodPreparation and evaluation of imidazolium-modified support for the development of facile DNA extraction method

○柿倉 泰明（（地独）大阪産業技術研究所)
○YASUAKI KAKIKURA (Osaka Research Institute of Industrial Science and Technology)

【背景・目的】PCR に代表される核酸増幅法を用いた検査は高い感度を有する手法である。そのため、医療や農畜産等の分野において、試料中の微生物やウイルス由来の核酸の検出による感染症診断などに応用されている。核酸増幅法による検査では、一般的にその精度を高めるための前処理として、試料中から核酸抽出が行われる。現在普及している前処理法は、グアニジン塩酸などのカオトロピック塩存在下でのシリカゲル表面への核酸吸着、洗浄および溶出による抽出法であるが、スピンカラムを用いた遠心分離や有機溶媒による洗浄処理といった煩雑な多段階の操作を要する。本研究では、イミダゾリウムカチオンと核酸の静電的相互作用を利用した核酸吸着担体を作製し、遠心操作や有機溶媒処理を伴わない簡便な DNA 吸着および溶出による抽出法について基礎的検討を行った。

【方法・結果】有機官能基を有する 3 種類のアルコキシシランを原料として、ゾル―ゲル法によりチオール基を有するシリカゲルを得た。このシリカゲルにビニルイミダゾリウムとラジカル発生剤の混合液を浸漬して加熱し、イミダゾリウムをシリカゲル表面に ene-thiol 反応で修飾することにより核酸吸着担体を作製した。得られた核酸吸着担体に大腸菌の精製ゲノム DNA 溶液を通過させた。続いて、核酸吸着担体を水で通液洗浄し、溶出液として高塩濃度の緩衝液を通過させた。これらの通過液を回収し、16S rRNA 遺伝子を検出対象としたリアルタイム PCR に供した。その結果、核酸吸着担体表面に DNA が特異的に吸着され、溶出液の通過によって吸着した DNA を回収可能であることが示された。この結果から、遠心操作や有機溶媒を使わない DNA 抽出技術開発の可能性が示唆された。現在菌体からの DNA 抽出の検討を進めており、この結果も併せて報告する。

Imidazolium modified silica (IMS) was applied for facile DNA extraction without multiple centrifugation steps and organic solvent pretreatment. The IMS was capable of specifically adsorbing genome DNA by electrostatic interactions with the imidazolium. The eluent whose main component is high concentration buffer solution could effectively recover the DNA from the sorptive phase of IMS. The results demonstrate that the IMS based technique could be a potential candidate of the facile extraction of DNA, which is compatible with downstream diagnostic approaches such as PCR.

DNA extraction, imidazolium-modified support, PCR detection

講演番号：2C03-12
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 10:00～ ミーティングルーム C

DNA コロイド結晶を反応場として活用する試み

Trial of the application of DNA colloidal crystals to bioengineering

横森 真麻[2]、○菅野 茂夫[1]、中村 彰良[1]、田川 美穂[2] ([1]産総研・生物プロセス、[2]名大・未来研)
Maasa YOKOMORI[2], ○S Shigeo SUGANO[1], Akiyoshi NAKAMURA[1], Miho TAGAWA[2] ([1]AIST, [2]Nagoya Univ.)

There is a growing need to localize macromolecules into small space and construct reaction fields, such as nucleic acid detection reactions using CRISPR/Cas system to detect viruses. It is known that DNA-functionalized gold nanoparticles (DNA-AuNP) can grow to form micrometer-sized colloidal crystals under specific conditions. The colloid crystals, DNA-AuNP superlattices, have been studied in the field of crystallography, but they have not been applied to bioengineering. In this study, we aimed to develop a reaction field by encapsulating macromolecules to the DNA-AuNP superlattice through appropriate modification of the crystals. Using biotin-streptavidin interaction, the encapsulation of Q-dot fused with streptavidin into the biotin-functionalized DNA-AuNP superlattice. In addition, genome editing component, Cas9-gRNA complex, was successfully attached with the DNA-AuNP superlattice. Our study suggests that the DNA-AuNP superlattice can be used as a reaction field of macromolecules and enzymes.

CRISPR/Cas システムを用いた核酸の検出反応がウイルスの検知に役立つなど、近年、生体分子を局所的に存在させ、反応場を構築する技術が注目を集めている. DNA 機能化金ナノ粒子(DNA-AuNP)は、特定の条件下において、マイクロメートルサイズのコロイド結晶を形成することが知られている。このコロイド結晶（DNA-AuNP 超格子）は、結晶学の分野で研究されてきたが、生物工学への応用には至っていない。本研究では、DNA ナノ粒子の結晶化反応を適切に操作することで、DNA-AuNP 超格子に高分子を封入し、反応場を開発することを目指した。ビオチン-ストレプトアビジン相互作用を利用して、ストレプトアビジンと融合した Q-dot をビオチンで機能化した DNA-AuNP 超格子に封入することに成功した。さらに、ゲノム編集因子である Cas9-gRNA 複合体を DNA-AuNP 超格子に結合できることも分かった。ビオチンーストレプトアビジン相互作用は様々な生体分子に利用できるため、DNA-AuNP 超格子が生物工学分野において反応場として利用できる可能性がある。

DNA nanoparticle, colloidal crystal, biotin-streptavidin

講演番号：2C03-13
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 10:00～ ミーティングルーム C

Ribosome 生合成プロセス解析のための Selected reaction monitoring 法

Selected reaction monitoring for the analysis of *Escherichia coli* ribosome biogenesis

○小坂 唯心[1]、森 めぐみ[1]、青木 航[1,2]、植田 充美[1,2]([1]京都大学農学研究科応用生命科学専攻、[2]京都バイオ計測センター)
○YUISHIN KOSAKA[1], MEGUMI MORI[1], WATARU AOKI[1,2], MITSUYOSHI UEDA[1,2] ([1]Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]Kyoto Integrated Science & Technology Bio Analysis Center)

リボソーム遺伝子への変異導入は細胞の生育を阻害するため、*in vivo* でのリボソーム改変は困難である。そこで、大腸菌破砕液においてリボソーム構成要素遺伝子を発現させることで、リボソームを効率よく再構成・改変することを目指している。この戦略の検証と改善のため、リボソーム構成要素を網羅的に定量するための方法の開発を試みた。三連四重極型質量分析計を用いた Selected reaction monitoring (SRM)では、目的のタンパク質を高い特異性で定量することができる。しかしながらリボソームタンパク質を網羅的に定量するための SRM 法は未だ開発されていなかった。本研究において、精製リボソーム・大腸菌ライセート・過剰発現株ライセート由来のリボソームタンパク質を分析し、大腸菌リボソーム構成要素を網羅的に分析するための SRM 法を構築した。また本研究で開発された SRM 法を用いて *in vitro* で合成したリボソームタンパク質の分析を行い、54 種のリボソームタンパク質のうち 41 種が検出できた。本手法を展開することで、大腸菌の全リボソームタンパク質を高い特異性で定量することを可能にしたい。

The reconstruction of *E. coli* ribosomes is a necessary for the creation of artificial ribosomes which will broaden polymer science. Due to the constraints regarding cell growth, modification of ribosomal genes *in vivo* is challenging. To achieve the efficient reconstruction and engineering of the artificial ribosome, we are trying to reconstruct the ribosome biogenesis process in *E. coli* lysate by expressing all of the ribosomal components so that the transcription, translation, and assembly of each ribosomal building block proceed cooperatively. For the optimization and verification of this strategy, analytical tools for each ribosomal components and reconstructed ribosome is necessary. We developed a highly-specific method for the quantification of all of the ribosomal proteins (r-proteins). Selected reaction monitoring (SRM) enables us highly-specific quantification of targeted proteins even if their concentrations are very low in samples. In this study, we analyzed r-proteins derived from purified ribosome, *E. coli* lysate, and r-protein-overexpressed *E. coli* lysate using nanoLC–MS/MS (LCMS-8060) to select SRM transitions with high sensitivity. We successfully determined SRM transitions for each ribosomal component by analyzing r-proteins derived from purified ribosome, *E. coli* lysate, and r-protein-overexpressed *E. coli* lysate. Using the SRM methods, we could quantify 41 among 54 nascent r-proteins synthesized in *E. coli* lysate [1].
[1] Kosaka, Y., Aoki, W., Mori, M., Aburaya, S., Ohtani, Y., Minakuchi, H., and Ueda, M (in press)

Escherichia coli ribosome, Selected reaction monitoring, Liquid chromatograph-triple quadrupole mass spectrometer

発表責任者：小坂　唯心（kosaka.yuishin.27e@st.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：2C03-14
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 10:00～ ミーティングルーム C

Improving the sensitivity of odor molecule detection in olfactory receptor-expressing cells

○Yujia LIAN[1], Kenji TATEMATSU[1], Hinako SAKAI[1], Sho SATO[2], Shun'ichi KURODA[1,2]
（[1]Osaka Univ., [2]Komi Hakko Corp.）

Visual and auditory information has been digitized to enable accurate recording and playback of information by video and music, respectively. Olfactory information can be digitized by electrical sensors using semiconductor devices and odorant molecule-specific binding membranes. However, these sensors could not record accurately how the human olfactory perceives the odorant molecules (*i.e.*, human sense of smell), because their recognition properties are very different from those of human olfactory receptors. Therefore, several groups including us have been trying to avoid the issue of odorant molecule recognition of these sensors by expressing all human olfactory receptors (ORs: approx. 400 subtypes) in cultured cells and using them as odorant sensors. We have fabricated an odorant sensor arrayed with cells expressing 388 human olfactory receptor subtypes each and used it to digitally record the human sense of smell. The sensitivity of this odorant sensor to odorant molecules, unfortunately, was not as high as in humans. In olfactory neurons, binding of odorant molecules to OR activates adenylate cyclase *via* the G protein $G_{\alpha olf}$, which increases intracellular cAMP levels, opens cyclic nucleotide-gated (CNG) channels, and allows extracellular calcium ions to flow into the cell. This intracellular signaling pathway is regulated by a negative feedback mechanism by the incoming calcium ions and causes desensitization of the odorant response. Our odorant sensor mimics this signaling pathway and causes similar desensitization. In this study, we thought that suppressing this desensitization mechanism would increase the sensitivity of our odorant sensor. To examine this possibility, the expression and function of the proteins involved in this desensitization mechanism were suppressed by siRNAs and various drugs, respectively. We finally found conditions under which olfactory receptors expressed by cells are close in sensitivity to human endogenous olfactory receptors.

Olfactory receptor, Biosensor, Signal transduction

発表責任者：黒田俊一（skuroda@sanken.osaka-u.ac.jp）

講演番号：2C03-15
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 10:00～ ミーティングルーム C

放射光 X 線を利用した生物素材・食品中のミネラル分布の可視化

Visualization of mineral distribution in biological materials and foods using synchrotron radiation X-ray.

○日高 將文、門田 佳奈、藤井 智幸（東北大農）
○Masafumi HIDAKA, Kana MONTA, Tomoyuki FUJII (Tohoku Univ.)

物質の内部構造を非破壊で可視化する方法として X 線の吸収を利用した Computed Tomography 法（X 線 CT）が注目されている。生物素材・食品を対象とした X 線 CT では、主として固相と気相の密度差に由来する X 線吸収率の差をコントラストとして、内部空隙を可視化した分析などが報告されている。我々は、長波長の X 線を用いると元素ごとの吸収率の差が大きくなり、結果として生物素材を構成する軽元素群（H、C、N、O）とミネラル群（Na、Mg、P、S、Cl、K、Ca）の X 線吸収率の差が顕著となることに着目した。波長 1 Å の X 線を用いる場合、質量比で 1%のミネラル群からの X 線吸収への寄与が全体の 10%を占めると見積もられることから、ミネラル群が局在するサンプルでは、その局在がコントラストとして可視化できると予想される。そこで、食塩を添加したすり身ゲルを用意し、SPring-8 の BL14B2 で波長 1 Å の X 線を用いて CT を測定した。明瞭なコントラストが得られたサンプル（図 1）について、さらに元素組成分析を組み合わせた解析により、コントラストが塩分（ミネラル群）の局在に由来するものであることが示された。

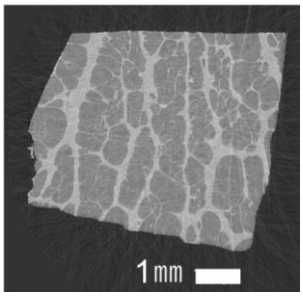


図 1 すり身ゲルの
X 線 CT の断層画像

The X-ray Computed Tomography method (X-ray CT) is an attractive method for non-destructively visualizing the internal structure of a substance. In X-ray CT for biological materials and foods, the analysis that visualizes internal voids has been reported, mainly using the difference in X-ray absorption as the contrast image derived from the difference in density between the solid phase and the gas phase. The difference in X-ray absorption ratio between light elements (H, C, N, O) and minerals (Na, Mg, P, S, Cl, K, Ca) becomes prominent, because the difference in absorption for each element becomes large under using long-wavelength X-rays. By using X-rays with a wavelength of 1 Å, it is estimated that minerals (1 wt%) account for 10% of the total X-ray absorption of the substance. Therefore, in samples where minerals are localized, it is expected that the localization can be visualized as contrast. We prepared surimi gels containing NaCl, and measured CT using X-rays with a wavelength of 1 Å at BL14B2 of SPring-8. We subjected the surimi samples to further analysis combined with elemental composition analysis. As a result, we revealed that the observed contrast was derived from the localization of NaCl (minerals).

X-ray CT, visualization, mineral

発表責任者：日高將文（masafumi.hidaka.a4@tohoku.ac.jp）

講演番号：2C05-01
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 11:00～ ミーティングルーム C

A new method for production of green biodiesel fuel using isopropanol as a co-solvent

○Thi Phuong Thao PHAM[1,4], Huynh Phuong Uyen NGUYEN[2], Kiyoshi IMAMURA[1], Masakazu FURUTA[1], Yasuaki MAEDA[3] ([1]Quantum and Radiation Engineering, Graduate School of Engineering, Osaka Prefecture University, [2]Sanicon Co. Ltd., [3]Graduate School of Life and Environmental Science, Osaka Prefecture University, [4]Center for Research and Technology Transfer, Vietnam Academy of Science and Technology)

Recently, biodiesel fuel (BDF) produced from plant oils has been considered as an alternative energy for fossil fuel. The researchers have been seriously interested in the BDF production technology. Co-solvent method, a homogenous reaction system using a co-solvent, has been found to have significant advantages for accelerating the transesterification rate in BDF production from plant seed oils compared to the conventional technology, a heterogeneous reaction system. Up to now, an acetone has been used as a co-solvent for BDF production. In this study, we examine to use isopropanol (IPA) as a co-solvent. IPA could be dissolved with plant oils and potassium hydroxide (KOH)/Methanol by more than 15% IPA in oil. The optimal conditions for transesterification for biodiesel production from canola oil were as follows: 15 wt.% of IPA, 6:1 molar ratio of methanol to oil, 1.0 wt.% of KOH to oil, and reaction temperature of 30oC. The produced biodiesel quality meets the standards JIS K2390 and EN14214 on FAME yield, free fatty acid, and water content. The reactions between oil and IPA, oil and methanol were examined. The reaction between with IPA was less than 8%, thus insignificant in comparison with the reaction with methanol. The back reaction between from glycerol and fatty acid methyl esters did not proceed. The transesterification using IPA as the co-solvent could reduce time reaction and phase separation after reaction, and further minimizes the waste from the reaction system. Moreover, the recovery of IPA after reaction is more facile than acetone, which is a popular co-solvent, thus it could save energy and chemical amount consumption. These results suggest a potential method utilizing IPA as co-solvent for BDF production from plant oil feedstocks.

green biodiesel fuel, co-solvent method, isopropanol

発表責任者：Pham Thi Phuong Thao（dc106005@edu.osakafu-u.ac.jp）

講演番号：2C05-02
質疑応答日時、会場：3月19日 11:00～ ミーティングルームC

コレステロール低下作用を有する孟宗竹リグノヘミセルロースの調製と作用機構の解析

Preparation of Bamboo Ligno-hemicellulose Hydrolysate Possessing Cholesterol-lowering Effect and Their Function Analysis

○王 建鵬[1]、平本 茂[1]、盧 超[1]、池山 菜緒[2]、雪 真弘[2]、大熊 盛也[2]、坂本 光央[2]、椎葉 究[1]（[1]東京電機大理工、[2]理研）
○JIANPENG WANG[1], SHIGERU HIRAMOTO[1], CHAO LU[1], NAO IKEYAMA[2], MASAHIRO YUKI[2], MORIYA OHKUMA[2], MITSUO SAKAMOTO[2], KIWAMU SHIIBA[1]（[1]Tokyo Denki Univ., [2]Riken）

[目的]バイオマス竹を機能性食品素材や天然薬物の原料として利用するために、リグノヘミセルロース加水分解物（BHH）の高コレステロール血症抑制活性測定と作用機構を解析する
[方法]雄性C57BL/6Jマウスに、高脂肪食とBHH混合餌を5週間投与した。投与終了後の血清コレステロール値と糞便pH測定の測定、および腸内細菌叢のメタゲノム解析を行った
[結果]BHH混合餌は高脂肪食のみ給与区（コントロール区）と比較して、1）血清コレステロールが低下した。2）糞便pHが低下した。3）腸内細菌のうち*Bacteroides*属細菌類の増加と*Firmicutes*属細菌の減少が認められ、*Bacteroides*属細菌中特定の菌種の増加が認められた。
[考察]BHHの血清コレステロール上昇抑制作用機構は、大腸内における*Bacteroides*属細菌類のある種の細菌の増加により短鎖脂肪酸の分泌が増加、短鎖脂肪酸による肝臓におけるコレステロール合成阻害が推定された。

[Aims] To measure the hypercholesterolemia inhibitory activity of bamboo hemicellulose hydrolysate (BHH) as a raw material for functional food materials and natural drugs, and to analyze functional mechanism.
[Methods] Male C57BL / 6J mice have been fed a high-fat diet supplemented with/without BHH for 5 weeks. Measurement of serum cholesterol level after the end of administration. Measurement of fecal pH and metagenomic analysis of intestinal biota.
[Results] The high-fat diet supplemented with BHH made mice lower serum cholesterol than the high-fat diet alone. BHH lowered the fecal pH. When BHH was fed to mice, mice intestinal biota was changed to increase in number of genus *Bacteroides* and decrease genus *Firmicutes*.
[Discussion] These results suggested BHH supplementation caused the inhibition to increase in the serum cholesterol due to activation of intestinal microorganisms such as *Bacteroides* resulting in the production of SCFA, and SCFA would inhibit cholesterol synthesis system in the liver.
[Reference] M. Maemura *et. al.*, Preparation of Bamboo Hemicellulose hydrolysate possessing anti-oxidative properties and their effect on mice plasma cholesterol. Food Sciences and Technology Research, 22(4), 537-543, 2016

bamboo ligno-hemicellulose hydrolysate, cholesterol-lowering, intestinal microflora

講演番号：2C05-03
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 11:00～ ミーティングルーム C

Screening and heterologous expression of fungal feruloyl esterases, a lignin-carbohydrate complex degrading enzymes, in *Pichia pastoris* X-33

○Apisan Phienluphon[1,2], Keiko Kondo[2], Takashi Nagata[1,2], Masato Katahira[1,2] ([1]Grad. sch. of Energy Sci., Kyoto Univ., [2]Inst. of Advanced Energy., Kyoto Univ.)

Fungal lignocellulose-degrading enzymes are widely used in the biochemical industry especially in degradation of agricultural biomass. Feruloyl esterases (FAEs) are a group of enzymes that hydrolyze the ester-linkage between hydroxycinnamic acid and hemicellulose in the lignin-carbohydrate complex (LCC). FAEs-catalyzed reaction results in dissociation of lignin and carbohydrate, by which the recalcitrant structure of biomass loosen up. Previously, an abundance of fungal FAEs was classified into 13 subfamilies (SF) but only a few FAEs have been functionally and structurally characterized. Recent studies reported that FAEs from SF5 and SF6 have high hydrolysis activity against natural substrates. Here, we aim to screen new FAEs from SF5 and SF6 that exhibit higher activity to realize efficient biomass pretreatment. Two FAEs of SF5 (Fae1 and Fae2) and three FAEs of SF6 (Fae3, Fae4, and Fae5) containing cellulose binding module (CBM) were selected from the JGI database. The selected FAEs and their CBM-deleted mutants were subcloned and heterologously expressed in *Pichia pastoris* X-33. Fae1, Fae2, and their mutants (Fae1-ΔCBM and Fae2-ΔCBM) were successfully expressed and purified by nickel affinity chromatography. FAE activity assay was performed using *p*-nitrophenyl ferulate as a substrate. Fae1 and Fae1-ΔCBM have the specific activity of 6.69 U/mg and 8.56 U/mg, respectively. These values are approximately 2- and 2.5-fold higher than the specific activity of AsFaeE (3.44 U/mg), which is one of the characterized SF6 FAEs having activity to various substrates. These results suggest that Fae1 and its mutant are promising candidates for efficient biomass degradation.

Feruloyl esterase, Lignin-carbohydrate complex, Lignocellulosic biomass

発表責任者：Apisan Phienluphon（apisan.phienluphon.22c@st.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：2C05-04
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 11:00～ ミーティングルーム C

Subsurface Cultivation and Gasification (SCG) - What is the condition for the successful generation of biomethane in the SCG?

○Akio UENO[1], Satoshi Tamazawa[1], Shuji Tamamura[1], Takuma Murakami[1], Tamotsu Kiyama[1], Hidenori Inomata[1], Noritaka Aramaki[2], Shinji Yamaguchi[3], Takeshi Naganuma[4], Katsuhiko Kaneko[1] ([1]H-RISE, [2]National Institute of Technology Kagawa College, [3]Mitsubishi Material Co. Ltd., [4]Hiroshima University)

【Introduction】Horonobe Research Institute for the Subsurface Environment is advancing technological development to convert unused organic matter harbored in the lignite layer of the Tempoku Coalfield in Hokkaido into biomethane by microorganisms and proposed the Subsurface Cultivation and Gasification method (SCG)[1,2]. The SCG comprises the following 5 stages: ①drilling of sedimentary rock or lignite layers, ②hydraulic fracturing by high pressure water injection, ③oxidative decomposition of persistent organic matter by H_2O_2 injection, ④Cultivation of methane-producing microorganisms *in situ*, and ⑤production of methane. In the final steps ④ and ⑤, methanogenic microorganisms in the *in situ* environment are expected to produce methane using low-molecular-weight organic matter generated from the reaction between lignite and H_2O_2 (hereinafter called Lig+H_2O_2 solution). However, it is important to clarify how much low-molecular-weight organic matter should be produced in the *in situ* environment and what kind of microorganisms would be involved for the practical application of the SCG. In this study, we verified methane production in a laboratory culture experiment using a microbial consortium obtained from the groundwater in the lignite layer.

【Materials and methods】An outcrop lignite in the Teshio Experimental Forest of Hokkaido University was used as the lignite sample. Total organic carbon (TOC) of Lig+H_2O_2 solution was measured according to the previous study[3]. Using Hungate tubes for anaerobic culture, we prepared media with a salt concentration close to that of the groundwater of the Tempoku Sarufutsu Coal Mine, and then 3 experimental groups were set by adding 1,000, 100, and 10 mg C L^{-1} (final conc.) Lig+H_2O_2 solutions. Groundwater derived from the coal seam collected in the coal mine, which is in the same layer as the above-mentioned lignite, was used as the microbial inoculum ($3.8\times10^5 \pm 1.0\times10^5$ cells ml^{-1})[4], and then $\times10^{-1}$ volume was added to the media. Cultivation was conducted in a dark at 30°C. Methane in the headspace was measured by gas chromatography. On the final day of culture (day 160), total DNA was extracted from the media, and microbial community structure analysis was performed using the 16S rRNA and *mcr*A genes as markers.

【Summary of this study】It was found that about 8 μmol (= 96 μg C L^{-1}) of methane was produced from the experimental group to which 1,000 mg C L^{-1} of Lig+H_2O_2 solution was added, and the methane conversion efficiency was calculated to be about 0.01%. On the other hand, methane production was below the detection limit in the 100 and 10 mg C L^{-1} Lig+H_2O_2 solution-added groups. Those results showed that a higher concentration of Lig+H_2O_2 solution would be required for the success of the SCG method. We plan to clarify how to increase the above-mentioned methane conversion efficiency and which taxa and methane-producing archaea would play a major role in the SCG using next-generation sequence analysis.

【References】1)Aramaki *et al.*(2017) Energ Convers Manage 153, 566-575, 2)Patent No. 6396068 (2018), 3)Haq *et al.* (2018) Int J Coal Geol 185, 1-11., 4)Ueno *et al.* (2019) Geomicrobiol J 36, 303-316.

Subsurface Cultivation and Gasification (SCG), lignite, methane

発表責任者：上野　晃生（akio.ueno@h-rise.jp）

講演番号：2C05-05
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 11:00～ ミーティングルーム C

Source of oxygen in the phenol formation from benzene by nitrate-reducing *Azoarcus* sp. DN11

○Allan DEVANADERA[1], Chiho SUZUKI-MINAKUCHI[1,2], Yuki KASAI[3], Yoh TAKAHATA[4], Kazunori OKADA[1], Hideaki NOJIRI[1,2] ([1]BRC, UTokyo, [2]CRIIM, UTokyo, [3]Chuo Univ., [4]Taisei Corp.)

[Introduction] Three initiating pathways have previously been proposed for anaerobic benzene ring activation: methylation to toluene, hydroxylation to phenol, and carboxylation to benzoate. However, the intial benzene activation have not yet been identified. *Azoarcus* sp. DN11, a denitrifying bacterium, has been shown to be capable of degrading benzene, toluene, benzoate, but not phenol, under both oxic and anoxic conditions (Kasai *et al.*, 2007, *Environ. Sci. Technol.*, 41, 6222-6227). Analysis of DN11 genome showed the presence of putative genes encoding enzymes for anaerobic degradation of toluene, phenol and benzoate, which suggests that DN11 may employ all the three pathways to degrade benzene anaerobically (Devanadera *et al*., 2019, *Microbiol Resour Announc, 8,* e01699-18). GC-MS analysis using ^{13}C-benzene identified labelled phenol, but not toluene or benzoate, as an intermediate in the anaerobic benzene degradation of DN11. Moreover, RNA-Seq analysis of the whole transcriptome of DN11 during anaerobic benzene degradation revealed the simultaneous transcription of aerobic benzene degradative and anaerobic phenol degradative genes. This report focuses on the GC-MS detection of phenol formation in benzene-degrading DN11 cultures supplemented with ^{18}O-labelled compounds to provide evidence on the incorporation of oxygen into benzene from water. **[Methods]** To determine the involvement of oxygen in the production of phenol during anaerobic benzene degradation by DN11, biodegradation test in isotopically-labelled water (water-^{18}O, 97 atom %^{18}O) was set-up. The incubation was performed in an anaerobic medium containing 42.95% $H_2{}^{18}O$, 15 μM initial benzene and 6 mM nitrate. The phenol formed in benzene-degrading cultures were extracted using diethyl ether after 14 days of incubation under anaerobic conditions. The ether extract was then analyzed using GC-MS for the formation of ^{18}O-phenol. **[Results]** ^{18}O-phenol was not detected in DN11 culture enriched with ^{18}O-water which suggests that water did not take part in the phenol formation from benzene. An intra-aerobic pathway of oxygen production from nitrite, a known intermediate of denitrification oathway, by employing the putative nitric oxide dismutase (*nod*) has been shown in *Candidatus* M. oxyfera and γ-proteobacterium strain HdN1 *(*Ettwig *et al.*, 2010, *Nature*, *464*, 543-548; 2012, *Front. Microbiol.*, *3*, 273, respectively). Moreover, a benzene-degrading nitrate-reducing continuous culture has been shown to produce oxygen from nitrate to activate aerobic benzene degradative genes (Atashgahi *et al.*, 2018, *Sci. Rep.*, *8*, 1-12). This intracellular production of oxygen may explain the absence of ^{18}O-labelled phenol in DN11 cultures with ^{18}O-labelled water. DN11 may employ this pathway producing oxygen under nitrate-reducing conditions to activate oxygenic mechanism of benzene degradation.

biodegradation, benzene, Azoarcus

発表責任者：Hideaki NOJIRI（anojiri@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2C05-06
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 11:00～ ミーティングルーム C

How do solid-phase humic substances (humin) serve as extracellular electron mediator in multiple anaerobic microbial reactions?

○Minh Duyen Pham, Takuya Kasai, Arata Katayama (Nagoya Univ.)

The discovery of the function as an extracellular electron mediator (EEM) of humin (a solid fraction of humic substances) in 2012 has provided insight into the role of humin in nature and its potential for *in situ* bioremediation of pollutants. While it is assumed that soluble mediator would enter periplasmic space inside cell's membrane to donate/receive electron, the working mechanism of humin has not been understood. The approach to partially unveil this scientific gap was (1) summarizing the range of isoelectric point of humin, in relation with multiple microbial reactions, and (2) determining the chemical structures that support EEM functionality of humin. The isoelectric points of intact humin have been reported in the range from –380 mV to +272 mV vs. standard hydrogen electrode (SHE). Humin after being reduced (by either chemical ($NaBH_4$), electrical (–500 V vs. SHE), or by microbes (humin–reducing microorganisms)) could activate different microbial reactions (i.e. pentachlorophenol declorination (+399 mV, $E^{0'}$), denitrification (+421 mV, $E^{0'}$), Fe^{3+} reduction (-88 mV, $E^{0'}$), nitrogen fixation (–278 mV, $E^{0'}$), CO_2 reduction to acetate (–290 mV, $E^{0'}$)). Various humins extracted by different methods from Kamajima paddy soil (Aichi, Japan) were examined in a humin–dependent pentachlorophenol dechlorinating culture. This microbial consortium was developed and maintained in our laboratory for several years. A humin is considered to have EEM function when this culture has dechlorination activity. These humins were also electrochemically characterized by various measurements. We found that electron transferred through the surface of humin, in which the redox centers in humin were only connected conductively with the presence of water. Quinone structure, which is widely considered as main redox center in soluble humic substances, had minor contribution in EEM function of humin. Instead, non–quinone (NQ) functional groups (i.e. S–, N–containing structures) contributed mainly. The significant positive correlation (p<0.05) between the dechlorination rate and aliphatic hydrocarbon content, O=C–O and O=C–N functional groups in humin suggested the involvement of protein and/or peptidoglycan in humin in its EEM function.

Extracellular electron mediator, Solid-phase humic subtances, Redox-active centers

発表責任者：Minh Duyen PHAM（pham.duyen.minh@imass.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：2C05-08
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 11:00～ ミーティングルーム C

Solvent engineering studies on recombinase polymerase amplification

○Kevin Maafu Juma[1], Kenji Kojima[1], Shihomi Akagi[1], Kaichi Hayashi[1], Teisuke Takita[1], Ciara K O'Sullivan[2,3], Shinsuke Fujiwara[4], Yukiko Nakura[5], Itaru Yanagihara[5] ([1]Grad. Sch. of Agric., Kyoto Univ., [2]Universitat Rovira i Virgili, [3]ICREA, [4]Sch. of Sci. and Technol., Kwansei－Gakuin Univ., [5]Osaka Women's and Children's Hospital)

[Purpose]

Recombinase polymerase amplification (RPA) amplifies a target DNA sequence with a recombinase enzyme, a single-stranded DNA-binding protein (SSB), and a strand-displacing polymerase[1)]. uvsX is the recombinase that is the RecA/Rad51 ortholog, uvsY is the recombination mediator protein, and gp32 is the SSB. Unlike PCR which relies on thermal cycling, RPA is performed at a constant temperature between 37 and 42°C, making it a potential technique for the onsite detection of various pathogens when combined with DNA extraction and amplicon detection techniques. The purpose of this study was to prepare recombinant T4 phage proteins and use them to examine the effects of reaction conditions and additives on the efficiency of RPA.

[Methods]

1. Preparation of T4 recombinant proteins**:** DNA fragments encoding each of uvsX, uvsY, or gp32 with $(His)_6$ tags and thrombin cleavage sites at its N- and C-terminal sites were inserted into pET-28a (+). This was introduced into *E. coli* BL21 (DE3), transformed bacteria cells were cultured, and enzymes were purified from the cells. 2. RPA reaction: RPA reaction was carried out with prepared uvsX, uvsY, and gp32 in a PCR tube at 41°C for 1 h. A 210-bp part of the ORF2 of rice yellow mottle virus (RYMV) was used as a target.

[Results and Discussion]

On SDS-PAGE, the purified uvsX, uvsY, and gp32 preparations yielded a single band with molecular masses of 43, 22, and 34 kDa, respectively. From a one-liter culture, 1.3 mg uvsX, 0.6 mg uvsY, and 1.6 mg gp32 were obtained. When RPA was performed in the presence of the standard DNA, uvsX, uvsY, gp32, *Bst* DNA polymerase, creatine kinase, and DTT, the 210-bp band was clearly observed but no band was observed in the absence of standard DNA, uvsX, gp32, or *Bst* DNA polymerase. RPA in the absence of uvsY, creatine kinase, or DTT, a less clear band was observed, indicating that these three components were not indispensable but contributed to an enhanced reaction efficiency. The optimal pH was 7.5–8.0, optimal CH_3COOK concentration was 40–80 mM, and optimal reaction temperature was 37–45°C. Dimethyl sulfoxide at 5% v/v and formamide at 5% v/v inhibited the reaction. The results suggest that RPA could be conducted using a wider range of optimal reaction conditions than those required for PCR and that RPA is highly suitable for point-of-care use[2)].

1) Lobato, I.M. and O'Sullivan, C.K. *Trends Analyt. Chem.*, **98**, 19–35 (2018)
2) Kojima, K. et al., *J. Biosci. Bioeng.* in press (doi: 10.1016/j.jbiosc.2020.10.001.)

Recombinase polymerase amplification, Single strand DNA-binding protein, Solvent engineering

講演番号：2C05-09
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 11:00～ ミーティングルーム C

Study on enzyme inhibition activity of solubilized Chaga (*Inonotus Obliquus*) obtained through hydrothermal treatment.

○Hazwanee Hamsan[1], Asuka Kushizaki[2], Kouhei Matsuda[2], Mikihide Demura[2], Seiji Noma[2], Teruko Konishi[3], Tadayuki Tsujita[2], Nobuyuki Hayashi[2] ([1]Kagoshima Univ., [2]Saga Univ., [3]Ryukyu Univ.)

Background: Chaga (*Inonotus obliquus*) is a mushroom parasitizes on white birch that is commonly used as a traditional remedy to treat a wide variety of human diseases without any intolerable toxic side effects. Currently, there have been many studies on Chaga mushrooms that focused on their biological properties that contribute to medical benefits. However, up to now, there is little efforts been done to study the potential of Chaga to be developed as valuable ingredients in cosmetics products. In this study, chaga extracts at different extraction conditions (low to high temperature treated extracts) were prepared and their property that have potential to be developed as cosmetic material were investigated.

Methods: Chaga samples in this study were prepared at various temperature and time (50˚C for 6 hours, 150˚C and 180˚C for 10 minutes) using hot compressed water method and soluble fraction was lyophilized. Then, the lyophilized samples of 50˚C were redissolved and hydrothermally treated again at 150˚C and 180˚C to obtain the sequential extracted samples and the samples were lyophilized again. The cytotoxicity of Chaga samples was screened by MTT assay using mouse embryonic fibroblast (MEF) cells. The skin aging-related enzyme inhibition activities which is elastase, collagenase and tyrosinase of the lyophilized Chaga samples were evaluated by using the spectrophotometric method.

Results: The yield of Chaga extract samples at 50˚C (209.4 mg/g-Chaga powder), 150˚C (253.1 mg/g-Chaga powder) and 180˚C (471.7 mg/g-Chaga powder) tends to increase in yield due to high temperature extraction. The safety profile obtained shows that Chaga samples is safe and does not have cytotoxicity effects for up to 10 mg/mL of Chaga. Collagenase inhibitory activity increased from about 15% in the 50˚C extract to 40% in the 150˚C extract and 56% in the 180˚C extract. The tendency for the inhibitory activity to increase at high temperature extract were also observed for elastase and tyrosinase. The inhibitory activity of the enzyme at sequential extracted samples where the freeze-dried 50˚C extract was redissolved and hydrothermally treated again at 150˚C and 180˚C was the same as or higher than that of the single-step extracted samples. This may prove that the bioactive constituents that are contributing to the inhibition properties of Chaga is abundant at high temperature and sequential extracted samples, thus the results indicate that at that conditions, Chaga samples possess a promising skin aging-related enzyme inhibition activity.

Conclusion: These findings suggest that Chaga could contribute to the development of cosmetics and beauty food products as Chaga may play a role in preventing the loss of skin elasticity, reducing skin wrinkling and sagging, act as skin-whitening agent and treatment of hyperpigmentation of skin.

Chaga, Hydrothermal treatment, Skin aging-related enzyme inhibition

発表責任者：Nobuyuki Hayashi（yurika@cc.saga-u.ac.jp）

講演番号：2C05-12
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 11:00～ ミーティングルーム C

Functional analysis of maltose utilization related genes in Aspergillus oryzae

○Yahong Zou, Sitong Zhan, Takahiro Shintani, Katsuya Gomi (Tohoku Univ.)

Aspergillus oryzae is an essential industrial microorganism in the brewing industry. One of its main characteristics is the production of large amounts of amylase (α-amylase, glucoamylase, and α-glucosidase). The activation substrate of the transcription factor AmyR essential for amylase gene expression is isomaltose converted from maltose incorporated into the cell by maltose transporter MalP. MalP-encoding gene (*malP*) constitutes, together with intracellular α-glucosidase MalT (*malT*) and transcription factor MalR (*malR*), the maltose utilization gene cluster (*MAL* cluster), which plays a major role in maltose assimilation.

In order to understand the production mechanism of amylase better, the function of genes related to maltose assimilation in *A. oryzae*, especially the role of *malT*, was investigated in this study. Interestingly, the *malT* deletion mutant showed a significantly poor growth on the maltose agar medium. The growth defect was also observed in the media containing other carbon sources supplemented with maltose, suggesting that maltose itself inhibits the fungal growth but not due to inability of assimilating maltose by MalT deficiency. The intracellular and extracellular maltose content in the liquid culture was analyzed by HPLC, and it was found that the *malT* deletion mutant can uptake maltose normally and that maltose was accumulated in the cell at high level, which may be one of the reasons for growth inhibition. Further study is required to elucidate how maltose accumulated in the cell inhibits the fungal growth. Also interestingly, the expression level of *malT* homolog that was thought to be unexpressed pseudogene increased in the malT deletion mutant, suggesting that *malT* homolog may compensate the *malT* deletion. We also found that extracellular maltose is decomposed by extracellular α-glucosidases, AgdA and AgdB. Currently, we are examining whether overexpression of *malT* homolog and *agdA*/*agdB* can restore the growth defect of the *malT* deletion mutant.

Aspergillus oryzae, MAL cluster, maltose utilization

発表責任者：Zou Yahong（yahong_zou@yeah.net）

講演番号：2C05-13
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 11:00～ ミーティングルーム C

Physiology and genomic analysis of forgotten deoxycholic acid producer, *Eubacterium* sp. c-25
○Isaiah Song[1], Satoru Fukiya[1], Yasuhiro Gotoh[2], Yoshitoshi Ogura[3], Tetsuya Hayashi[2], Atsushi Yokota[1] ([1]Hokkaido Univ., [2]Kyushu Univ., [3]Kurume Univ.)

Bile acids facilitate lipid digestion in mammals following a meal. Primary bile acids are those directly synthesized by the host liver, of which a small amount is converted into secondary bile acids by the colonic microbiota. The most abundant primary bile acid in humans is cholic acid (CA), which is converted to the secondary bile acid deoxycholic acid (DCA), a substance implicated in liver and colon carcinogenesis. Contrary to the high efficiency at which CA is transformed into DCA, only a handful of species of *Clostridium* are known to catalyze this conversion, alluding to the existence of other unknown DCA producers in the human gut. *Eubacterium* sp. c-25 is a relatively unknown DCA producer isolated from human feces in the 1980s that has the potential to be an unrecognized contributor to DCA production in humans. We thus conducted physiological and genomic analyses on *Eubacterium* sp. c-25 in comparison to established DCA producers. *Eubacterium* sp. c-25 and other DCA producers were cultured in Gifu Anaerobic Medium (GAM) supplemented with 0.1 mM CA at 37°C. An initial pH range of 6 to 9 was tested for growth rate, measured by OD_{660}, with samples taken periodically for bile acid profile analysis via UPLC-MS/MS. The genome was sequenced using a combination of Nanopore MinION and Illumina MiSeq, assembled with Unicycler, and annotated with DFAST. DCA producer genomes were analyzed for gene sequence similarity using GENETYX, particularly in regards to DCA-production genes (*bai* genes) and 16S rRNA. Overall genome characteristics and gene orthology were analyzed using OrthoFinder and eggNOG-mapper. *Eubacterium* sp. c-25 was found to grow optimally at pH 8, revealing a steady decrease in CA and increase in DCA as expected of DCA producers. However, DCA production was not consistent with growth rate, showing more rapid DCA production at initial pH 7. SEM and TEM analysis revealed that this strain mainly shows concatenated cell morphology. The closed *Eubacterium* sp. c-25 genome is comprised of a 3,042,110 bp circular chromosome with 2,893 coding sequences. 16S rRNA gene sequence identity to other DCA producers was low (82-92%), with the highest being the non-DCA-producer *Lachnoclostridium phocaeense* Marseille-P3177 at 97% according to BLAST results. Taken together, these results suggest that c-25 is a phylogenetically unique DCA producer in the human gut.

bile acid transformation, intestinal bacteria, deoxycholic acid

発表責任者：Atsushi Yokota（yokota@chem.agr.hokudai.ac.jp）

講演番号：2C05-14
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 11:00～ ミーティングルーム C

A novel gene cluster is involved in the degradation of lignin-derived monoaromatics in *Thermus oshimai* JL-2

○ Joydeep CHAKRABORTY[1], Chiho SUZUKI-MINAKUCHI[1,2], Takeo TOMITA[1,2], Kazunori OKADA[1], Hideaki NOJIRI[1,2] ([1]BRC, UTokyo, [2]CRIIM, UTokyo)

[Objective] High-temperature steam treatment of lignocellulosic biomass during the extraction of cellulose and hemi-cellulose fractions leads to the release of a wide array of lignin-derived aromatics into the natural ecosystem, some of which can have detrimental effects on the environment (Beckham et al., Curr. Opin. Biotechnol., 2016). Not only will identifying organisms capable of using such aromatics aid in environmental cleanup, but thermostable enzymes, if characterized, can be used for efficient lignin valorization. Though much emphasis has been given on lignin biodegradation to obtain industrially important valued commodities, relatively few studies have dealt with transformation of lignin-derived mono-aromatic compounds (de Gonzalo et al., J. Biotechnol., 2016). Because lignocellulose degradation and subsequent steps are often performed at higher temperatures, thermostable enzymes are the most desired tools to carry on the processes. A unique oxidoreductase gene cluster was identified in one of the plasmids of thermophilic nitrate reducer *Thermus oshimai* JL-2 based on a previous study (Chakraborty et al., AMB Exp., 2017). The present study aimed at finding possible correlation of the gene cluster with lignoaromatics degradation and to identify gene(s) therein with novel functions, if any. **[Methods**] Prediction of gene function and catabolic pathway mapping were done using Conserved domain (CD) database, MetaCyc and KEGG pathway database. Utilization of substrates by growing or resting-cell cultures of strain JL-2 was monitored by reverse-phase HPLC analysis of culture extracts. The cell-free extracts of JL-2 incubated in absence (control) or presence of substrates were assayed at 70°C for enzymatic transformation of catechol and protocatechuate using UV-visible spectrophotometer. Semi-quantitative RT-PCR was done to understand relative expression of the genes and to understand their regulation. Function of one of the genes was predicted upon its homologous recombination-based deletion using a thermostable kanamycin (*htk*) cassette. **[Results]** Catabolic pathway mapping indicated that the gene cluster can be divided into two operons, viz. upper and lower pathway operons, and should be capable of transforming lignin-derived monoaromatics. Degradation studies showed that the strain can indeed degrade *p*-hydroxybenzoate, vanillate and ferulate. *p*-Hydroxybenzoate acts as an inducer of the operon, as evidenced from spectroscopic and semi-quantitative RT-PCR analyzes. Vanillate was identified as one of the intermediates of ferulate catabolism under resting-cell conditions. We have detected the involvement of thermostable catechol 2,3-dioxygenase and a protocatechuate decarboxylase in the process through spectrophotometric studies, which suggests that the degradation proceeds via protocatechuate and catechol. A novel thermostable γ-carboxymuconolactone decarboxylase homolog has been identified as the protocatechuate decarboxylase based on gene deletion experiments. **[Conclusions]** A novel gene cluster involved in the degradation of lignin-derived monoaromatics has been identified in the strain JL-2. This gene cluster is conserved in only a few Thermales and shows traces of vertical expansion of catabolic pathways in these organisms toward lignoaromatics. Identification of a novel thermostable protocatechuate decarboxylase gene in the strain further adds to its significance, as such an enzyme can be efficiently used in the biosynthesis of *cis,cis*-muconate, an important intermediate in the commercial production of plastics.

Lignin-derived aromatics, Thermophile, Thermostable enzyme

発表責任者：NOJIRI Hideaki（anojiri@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2C05-15
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 11:00～ ミーティングルーム C

Genetic and functional analysis of Siderophore in Methylobacterium aquaticum 22A
○Patrick Juma[1], Ola Alessa[1], Yoshiko Fujitani[1], Tokitaka Oyama[2], Hiroya Yurimoto[3], Yasuyoshi Sakai[3], Akio Tani[1] ([1]IPSR, Okayama Univ., [2]Grad. Sch. Sci., Kyoto Univ., [3]Grad . Sch. Agric., Kyoto Univ.)

Methylobacterium aquaticum strain 22A is a plant-growth promoting, methylotrophic bacteria. The strain contains Ca^{2+}- and lanthanide (Ln^{3+})-dependent methanol dehydrogenases. The acquisition of Ln^{3+} is reported to be dependent on TonB-dependent receptor and ABC transporter that resemble to Iron-acquiring system. The strain 22A genome contains 8-genes cluster encoding staphyloferrin B-type siderophore. In this study we aimed to characterize the siderophore produced by strain 22A, including its function in plant growth promotion, bacterial survival, and Ln-uptake.

The siderophore gene cluster is conserved across the genomes of 5 strains of the *Methylobacterium* type species. The gene deletion mutant of strain 22A was defective in growth under iron-deficient condition. The siderophore exhibited adaptive features including tolerance to salinity, oxidative stress, and toxic metal sequestration. Strain 22A promoted duckweed growth whereas the mutant did not under iron-limited condition. Some *Methylobacterium* spp. can help the 22A mutant to grow in iron-deficient condition while other species inhibit the growth. Importantly, the siderophore and Ca^{2+}-dependent MDH (MxaF) mutant did grow on methanol in the presence of Ln^{3+}, suggesting that the siderophore is not involved in Ln^{3+} uptake.

Siderophore, Lanthanide, Methylobacterium species

講演番号：2C05-16
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 11:00～ ミーティングルーム C

Functional characterization of *Candida albicans* ABC transporter Cdr1: altered drug transport caused by mutations in transmembrane segment 7

○Xiaoxian SHEN, Kyoko NIIMI, Masakazu NIIMI, Susumu KAJIWARA (Tokyo Institute of Technology)

Candida albicans is a medically important fungal pathogen that causes superficial and systemic infections. However, the emergence of multidrug resistance (MDR) due to the wide-spread use of azole antifungals causes serious complications for the treatment of this life-threatening disease. The overexpression of the *Candida* drug resistance protein 1 (Cdr1), an ATP-binding cassette (ABC) transporter of the ABCG family, is the major cause of multidrug resistance in *C. albicans*. Site-directed mutagenesis of Cdr1 variants overexpressed in the genetically modified host *Saccharomyces cerevisiae* was employed to analyze structure-activity relationships in Cdr1. Major attention was placed on the importance of the amino acid residues, A1207 and A1208 in transmembrane segment 7 (TMS7). Previous studies uncovered the ability of A1207T and A1208V to recover Cdr1 transport function of Cdr1-Cdr2 chimeras in which the TMS5 of *CDR1* was replaced with TMS5 of *CDR2*, a close efflux pump homolog of Cdr1. Cdr1-A1207T was also isolated as a mutation that could recover fluconazole efflux pump function of Cdr1-E704K, a mutation that almost completely inactivated the protein. Cdr1-G521, a TMS1-residue located in the pseudosymmetrical position of A1208, was previously recognized as the entry gate residue for Cdr1 efflux pump substrates. To investigate whether A1207 and A1208 have a similar gate function, sixteen mutants were constructed and overexpressed in the yeast host. The A1207 and A1208 residues were each replaced with G, V, T, H, F, R, Y or W using a one-step PCR-based site-directed mutagenesis protocol. SDS-PAGE and confocal microscopy images of the yeast cells overexpressing these 16 Cdr1 variants showed that all Cdr1 mutants had similar expression levels and were correctly localized into the plasma membrane. Their minimum growth inhibitory concentrations (MIC_{80}) against eleven efflux pump substrates and their rhodamine 6G efflux pump activities revealed that replacing these important A-residues possibly caused local conformational changes that altered the substrate transport specificities in these Cdr1 mutants. However, no evidence of a size-dependent gate function was detected for A1207 or A1208, suggesting a function of these important residues that is different from the gate-function detected for Cdr1-G521. Our data confirmed the importance of alanine at positions 1207 and 1208 of Cdr1, but neither of these A-residues appeared to be part of a possible second gate between TMS5 and TMS7 of Cdr1. The detailed characterization of these two important residues further improves our understanding of the mechanism of drug efflux by Cdr1.

ABC transporter, *Candida albicans* Cdr1, multi-drug resistance

発表責任者：Xiaoxian SHEN（shen.x.aa@m.titech.ac.jp）

講演番号：2C05-17
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 11:00～ ミーティングルーム C

Altered gut microbiome of Indonesian obese and T2D subjects that associates with diet and drug

○Phatthanaphong THERDTATHA[1], Yayi SONG[1], Masaru TANAKA[1], Mariyatun MARIYATUN[2], Miisaroh ALMUNIFAH[2], Nancy Eka Putri MANURUNG[2], Siska INDRIARSIH[2], Yuan-Kun LEE[3], Endang Sutriswati RAHAYU[2], Jiro NAKAYAMA[1] ([1]Kyushu University, [2]Universitas Gadjah Mada, [3]University of Singapore)

INTRODUCTION: Rapid economic growth of Asian developing countries, especially Indonesia has affected on a drastic change in life and dietary styles among its people causing the growing population in obesity and diabetes, in which they become the national problem at present. To capture the status of Indonesian gut microbiota correlated with these diseases, fecal microbiomes and metabolomes of Indonesian adults, including dependent subjects of 21 obese, 25 type 2 diabetes (T2D) patients, and 25 healthy subjects together with their dietary and medical records were characterized.

METHODS: Fecal gut microbiome was analyzed by using the 16S rRNA gene amplicon sequencing with the universal primers targeting V3-V4 regions. Seven-day dietary information of subjects was applied to the NutriSurvey software supplemented with Indonesian food database and was subsequently investigated its correlation with obesity and T2D. Fecal bile acid measurement was accomplished by LC-MS/MS.

RESULTS: Multiple linear regression of macronutrient intake ratio revealed that BMI mainly depended on high fat intake. Obese group was characterized by low bacterial diversity with overgrowth of *Romboutsia* and a decrease of wide-range of commensal group, such as *Ruminococcaceae* and *Bacteroidaceae*, most likely gut dysbiosis. *Romboutsia* was positively correlated with fat intake ratio. On the other hand, T2D group specifically showed a difference in abundance of *Bacteroides fragilis*. It also showed significantly lower level of conjugated bile acids, notably TUDCA and GUDCA, which was recovered in the group administrated by metformin, an anti-diabetic drug. These results indicate gut microbiome of Indonesian obese and T2D subjects linking to diets and drug.

Indonesia, Obesity&diabetes, Gut microbiota

発表責任者：NAKAYAMA Jiro（nakayama@agr.kyushu-u.ac.jp）

講演番号：2C06-01
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 13:00～ ミーティングルーム C

植物発酵物（FBP）の青枯病防除効果

Control effect of fermented botanical product on bacterial wilt

○緋田 安希子[1]、鳥居 英人[2]、河本 亮[2]、藤岡 耕太郎[2]、岸田 晋輔[2]、田島 誉久[1]、加藤 純一[1]（[1]広島大院・統合生命、[2]万田発酵株式会社）
○Akiko HIDA[1], Hideto TORII[2], Ryo KAWAMOTO[2], Kotaro FUJIOKA[2], Shinsuke KISHIDA[2], Takahisa TAJIMA[1], Junichi KATO[1] ([1]Hiroshima Univ., [2]Manda Fermentation Co., Ltd.)

［背景・目的］植物発酵物（FBP）は黒糖をベースに 41 種類以上の果実類・穀類・海藻類などを 3 年以上発酵・熟成し製造された特殊肥料であり、作物の生育促進・増収・品質向上などの効果に加えて、青枯病を含む各種植物病害抑制へ有効との体感が使用者より寄せられている。青枯病の病原菌である土壌伝染性の *Ralstonia solanacearum* は世界中で深刻な農作物被害をもたらしており、現在有効な防除法が模索されている。そこで本研究では、FBP の青枯病防除効果について解析した。

［結果］トマト栽培系（土または砂）を FBP 希釈液により灌注処理した後、青枯病菌 *R. solanacearum* MAFF106611 株を灌注接種したところ、FBP 処理区では青枯病の大幅な抑制が確認された。しかし、FBP 自体に直接的な殺菌効果はなく、むしろ逆に基質として本病原菌の増殖を向上させることが判明した。また、青枯病菌の植物根への接近・定着には運動性が重要であることから、運動性関連遺伝子破壊株を用いて同様の感染試験を行ったが、当該防除効果への運動性の関与は確認されなかった。このことから、FBP は青枯病菌の植物根到達後に重要な病原性因子または植物自体（もしくはその両方）に作用することで高い防除効果を発揮する可能性が示唆された。現在 RNA-seq により、作用機序の詳細を解析中である。

FBP, which is abbreviation of Fermented Botanical Product, is a fertilizer produced taking more than three years by fermenting more than 41 kinds of materials including fruits, grains, and seaweeds. It has the effects of promoting growth, increasing yield, and improving quality of crops. In addition, user reports indicated that FBP may suppress various plant diseases including bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum*. Since bacterial wilt causes serious damage to economically important crops, it is an urgent need to develop effective methods to control the disease. We therefore investigated the control effect of FBP on bacterial wilt in this study.

Tomato seedlings were treated with a diluted solution of FBP by pouring it onto the soil or sand, and then *R. solanacearum* strain MAFF 106611 was inoculated by soil/sand-soak method. Seedlings treated with FBP showed significantly reduced symptoms compared to control. However, bacterial growth assay revealed that FBP acts as a growth substrate rather than antibacterial substance for this pathogen. Although motility is also an important factor in plant infection by *R. solanacearum*, virulence assay using mutants of motility-related genes suggested that there is no relationship between the control effect of FBP and motility of this pathogen. To elucidate the disease control mechanism, further analysis using RNA-seq is underway.

disease control, bacterial wilt, *Ralstonia solanacearum*

講演番号：2C06-02
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 13:00～ ミーティングルーム C

酵母資材がイチゴ根圏土壌微生物へ与える影響の評価

Effects of the yeast material on the bacteria and fungi in the strawberry rhizosphere soil

○猪原 英之[1]、高崎 智子[2]、北川 隆徳[1]、坂野 克久[1] ([1]アサヒクオリティーアンドイノベーションズ株式会社、[2]アサヒバイオサイクル株式会社)
○Hideyuki IHARA[1], SATOKO TAKASAKI[2], TAKANORI KITAGAWA[1], KATSUHISA SAKANO[1] ([1]Asahi Quality & Innovations, LTD, [2]Asahi Biocycle, LTD)

【背景】酵母細胞壁の水熱反応処理物（以下、酵母資材）は還元性を示し、鉄供給原料と共に施肥することで還元型の二価鉄としての供給が可能となるため、植物生育を良好にする効果が期待される。本発表では、イチゴ畑への酵母資材の施肥が土壌細菌及び真菌の群集構造に与える影響について報告する。【材料と方法】酵母資材を施肥した区画（試験区）と、施肥していない区画（対照区）それぞれから、イチゴ畑土壌（バルク土壌）、植物根（根）、根にこびりついた土（根圏土壌）を採取した。各サンプルから DNA を抽出した後、次世代シーケンサー(Miseq)に供試して細菌(16S rRNA)及び真菌(ITS2 領域)の群集構造を解析した。【結果と考察】対照区に比べて試験区ではイチゴ植物体の良好な生育が確認された。主座標分析の結果、バルク土壌、根圏土壌、根のいずれにおいても細菌/真菌群集構造が試験区と対照区で異なっていたことが示された(図 1)。また、根圏土壌では Bacillales 目の複数の細菌種が、対照区に比べて試験区で高い存在割合を示し、酵母資材の散布が土壌微生物に影響を与えたことが示唆された。

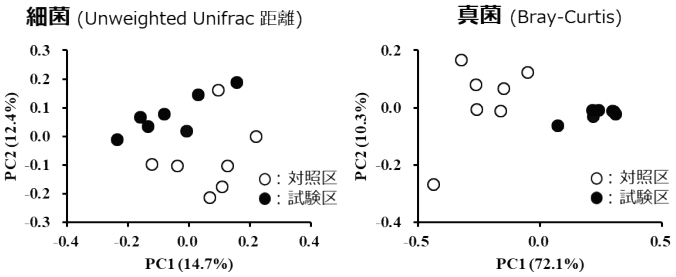


図1 根圏土壌の細菌/真菌群集の主座標分析結果 (n=7)

Yeast cell wall treated by hydrothermal reaction (hereinafter referred to as yeast material) can facilitate growth of cultivated plants. We herein report effects of the yeast material on the bacterial and fungal communities of the bulk soils, rhizosphere soils and roots at a strawberry farm. We collected samples from two sites: one site was supplied with the fertilizer containing yeast material (Treat) and the other was not supplied (Control). The bacterial and fungal communities of the samples were compared by high-throughput sequencing. The principal coordinate analysis showed differences in the bacterial and fungal communities of the bulk soils, rhizosphere soils and roots between the two sites. Besides, relative abundances of the certain species of the order Bacillales in the rhizosphere soils were higher in the treat site than those in the control site, suggesting that the yeast material effected on the bacteria and fungi in the soils and plant roots.

Soil microbial community, Rhizosphere soil, Yeast cell wall

発表責任者：猪原　英之（hideyuki.ihara@asahi-qi.co.jp）

講演番号：2C06-03
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 13:00～ ミーティングルーム C

里山環境での土地利用法ごとの微生物群集構造の解析

Analysis of soil microbial community structure by land use method in woodland near a village, Satoyama

○藤原 夕莉、堀沢 栄 (高知工科大学)
○Yuri Fujihara, Sakae Horisawa (Kochi Univ. Technol.)

近年里山は、様々な観点から有用性が高く重要な地域であると見直されている。高知工科大学では、2007 年より近隣の地域：佐岡地区を借り入れ里山工学に取り組んでいる。その一環として、土地利用や植生・生産力との関連が深い土壌の微生物群集を解析することとした。佐岡地区で取得された土壌コアから深度別に全 DNA を抽出,16s rDNA 配列によりバクテリア群の微生物群集構造を解析した。

結果(1)propionibacteria,Pseudonocardiales,Burkholderiales,Xanthomanadales が高い割合で存在し優占グループとなっていること (2)深層部では浅層部より多様性が低くなること、(3)微生物群集の類似性は菌の多様度よりも深度に影響を受けることが示唆された。

今後、各サンプルの類似度を算出する際の環境要因を追加、真菌についても群集構造の解析を行う、フィールド内の様々な地点で土壌を採取し同様の解析を行うことを進めていく予定である。

In recent years, Satoyama has been reviewed as a highly useful and important area from various points of view. Since 2007, Kochi University of Technology has been working on satoyama engineering in Saoka area near the university. As a part of this project, we investigated microbial communities in soil, which are closely related to land use and vegetation/productivity. The whole DNAs were extracted from the soil cores acquired in the Saoka area, and soil microbial community structure was analyzed based on the 16s rDNA sequencing. Results showed that (1) Propionibacteria, Pseudonocardiales, Burkholderiales, Xanthomanadales were presented in a high proportion and are a dominant group; (2) diversity is lower in the deep part than in the shallow part; (3) the similarity of microbial communities was related to the depth rather than the diversity of the microbes.

soil microbial community structure, metagenome, satoyama

発表責任者：堀沢　栄（horisawa.sakae@kochi-tech.ac.jp）

講演番号：2C06-04
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 13:00～ ミーティングルーム C

土壌肥沃度指標（SOFIX）による二次林の管理に対する土壌環境の解析

Evaluation of soil environment for secondary forests management based on SOFIX

○大野 雅貴、荒木 希和子、久保 幹（立命館大生命）
○Masaki ONO, Kiwako S. ARAKI, Motoki KUBO (Ritsumeikan Univ.)

里山や雑木林といった二次林は、継続的な管理により形成された森林である。近年、エネルギー資源の変化や化学肥料の開発に起因して管理が放棄される二次林が増加しており、このような森林では多機能性や健全性の低下が問題となっている。落枝落葉の過剰堆積は土壌生物による分解を妨げ、物質循環の停滞をまねくことが懸念される。したがって森林生態系において適切な管理を行うことで循環機能を向上させる必要がある。この循環機能は土壌の生物性、化学性、物理性といった観点から把握することができるが、これらの指標を統合的に用いた管理の土壌への効果はあまり検証されていない。本研究では土壌肥沃度指標（SOFIX）に基づいて管理条件の異なる様々な森林土壌を調査することで土壌成分や循環機能の特徴を把握し、実際に森林整備を行った森林の土壌環境の変化を経時的に調べ、森林管理の効果を検証することを目的とした。

はじめに国内の森林土壌を採取し SOFIX 分析を測定した。また、大学キャンパス内にある管理放棄林に区画（20 m × 50 m）を 4 つ設け、間伐を行った。間伐率は樹木の本数によって定義し、4 つの区画の間伐率をそれぞれ 80%、50%、20%、0%として施業した。さらに各区画内に 1 m^2 のプロットを設置し、プロット内の落葉落枝を除去した。月 1 回このプロット内と落葉落枝の除去を行っていない非管理の区画の計 5 区画から土壌を採取し SOFIX 分析を実施した。そのほかに林内の照度を測定した。森林土壌では総細菌数の平均値が 8.1×10^8 cells/g-soil、全炭素量が 44,000 mg/kg、全窒素量が 1,700 mg/kg、全リン量が 490 mg/kg、全カリウム量が 4,400 mg/kg、土壌 pH が 5.1 であり、樹園地と比較して全炭素量が多く、全リン量が少ない傾向にあった。管理実験では樹木の残存数は 80%区画で 230 本、50%区画で 640 本、20%区画で 1080 本であった。間伐により非管理区画の相対照度 0.4%に対し 80%区画で 30.9%、50%区画で 10.6%、20%区画で 2.9%となっていた。5 区画の土壌分析の結果、日本国内の森林土壌と同様の傾向は得られたが総細菌数、窒素循環活性は管理条件の違いによる明確な違いは見られなかった。しかし非管理区画と比較すると月ごとの総細菌数にばらつきが大きかった。

In this study, to understand the characteristics of soil properties such as composition and cycling functions, forest soils under different management conditions were investigated based on Soil Fertility Index (SOFIX). The effectiveness of forest managements on the soil environments were also evaluated in four plots at the different liberation cutting level.

forest, soil property, conservation

講演番号：2C06-05
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 13:00～ ミーティングルーム C

ハマトビムシの褐藻分解の仕組みの解明を目的とした腸管内微生物のメタゲノム解析

Metagenomic analysis of intestinal microorganisms for the purpose of elucidating the mechanism of brown algae decomposition in beach-hopper

○弓岡 潤矢[1]、中村 晟一朗[2]、馬場 保徳[1,2,3]、河井 重幸[1,2,3]（[1]石川県大生物資源、[2]石川県大院生物資源、[3]石川県大生物資源研）
○JUNYA YUMIOKA[1], SEIICHIRO NKAMURA[2], YASUNORI BABA[1,2,3], SHIGEYUKI KAWAI[1,2,3]
([1]Ishikawa Pref. Univ., [2]Ishikawa Pref. Univ. Grad. Sch., [3]Ishikawa Pref. Univ. Res Inst Biores Biotech.)

海岸に生息する小型の甲殻類であるハマトビムシが漂着した褐藻を食すのであれば、その腸管内には褐藻を分解する仕組みがあると考えられる。それを解明することで将来有望なバイオマス資源である褐藻の有効利用の方法を開発する一助となると期待された。

石川県柴垣海岸で採取したハマトビムシに褐藻と紙を与えて飼育した結果、ハマトビムシはそれらを食した。また、その腸管内からアルギン酸資化細菌、アルギン酸分解細菌、アルギン酸およびセルロースを分解する糸状菌を単離し、それらの性質を明らかにした。また、自然環境または滅菌環境で褐藻または紙を与えてハマトビムシを飼育し、腸管内微生物に対してメタゲノム解析（16S、18S、ITS 領域に対するアンプリコン解析）を行った。その結果、微生物叢は環境に依存せず個体間で大きく変動したが、アルギン酸資化細菌はほとんどの個体の腸管内に存在していた。さらに、抗生物質による介入を行って同様に飼育およびメタゲノム解析したところ、介入により褐藻の摂食に違いは見られなかったが、微生物叢には変化が観察された。

If a beach-hopper, a small crustacean that lives on the coast, eats the brown macroalgae that have drifted ashore, it is thought that there is a mechanism to decompose the brown macroalgae in its intestinal tract. It was hoped that elucidating this mechanism would help to develop a method for effective utilization of brown macroalgae, which is a promising biomass resource in the future.

As a result of feeding brown macroalgae and paper to the beach-hopper collected on Shibagaki coast in Ishikawa prefecture, the beach-hopper ate them. In addition, alginate assimilating bacteria, alginate-degrading bacteria, and filamentous fungi that decompose alginate and cellulose were isolated from the intestinal tract of the beach-hopper, and the properties of there microbes were clarified. In addition, brown macroalgae or paper was fed in a natural or a sterile environment to raise the beach-hopper, and metagenomic analysis to intestinal microorganisms (16S, 18S, amplicon analysis for the and ITS region) was performed. As a result, the microbiota fluctuated greatly among individuals regardless of the environment, but alginate-assimilating bacteria were present in the intestinal tract of most individuals. Furthermore, when the beach-hopper were bred and metagenomically analyzed in the same manner but with antibiotic intervention, no difference was observed in the feeding of brown algae by the intervention, but changes were observed in the microbiota.

metagenomics, brown macroalgae, alginate

発表責任者：河井重幸（kawais@ishikawa-pu.ac.jp）

講演番号：2C06-06
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 13:00～ ミーティングルーム C

微生物代謝を用いたリグニン由来芳香族物質からのβ-ケトアジピン酸の生産

Production of ß-ketoadipic acid from lignin-derived aromatic compounds by utilizing microbial metabolism

○鈴木 悠造[1]、大塚 祐一郎[1]、荒木 拓馬[1]、上村 直史[2]、政井 英司[2]、中村 雅哉[1]([1]森林総研、[2]長岡技科大・生物)
○Yuzo SUZUKI[1], Yuichiro OTSUKA[1], Takuma ARAKI[1], Naofumi KAMIMURA[2], Eiji MASAI[2], Masaya NAKAMURA[1] ([1]FFPRI, [2]Nagaoka Univ. Tech.)

木質系バイオマスの約 30%を構成するリグニンは、地球上で最も多く存在する天然由来の芳香族高分子である。我々は複雑な化学構造を持つリグニンを化学処理でいったん低分子化して得られる芳香族物質から、微生物の代謝機能を用いて特定の代謝中間体に収斂させ、ポリマー原料を生産する技術を開発してきた。以前、我々は *Sphingobium* sp. SYK-6 株や *Pseudomonas putida* KT2440 株の代謝機能を利用して、単量体のリグニン由来芳香族物質からβ-ケトアジピン酸（KA）が生産できることを報告した。KA は 6,6 ナイロンの原料であるアジピン酸にケトン基を付加した構造をしており、KA のケトン基を化学修飾により別の官能基に置換することで、既存のナイロンと同様の化学的特性をもちつつ新たな機能性を付与した新規のナイロンを合成できることが期待される有用物質である。しかしながら、原料として用いた芳香族物質の内、発酵阻害物質として知られるバニリンにからは、高収量の KA を生産することができなかった。一方、木材にアルカリ酸化処理を施すことで得られる芳香族成分の組成は、バニリンが高い割合を占めている。今回、我々はバニリンの添加速度や培養条件を検討することで、培養液 1 L あたり 10 g 以上の KA を生産することができた。現在、天然のスギ材から調製したアルカリ酸化処理物を原料として KA 生産試験を進めており、合わせて報告する予定である。

Lignin, which makes up nearly 30% of woody biomass, is the most abundant aromatic polymer compound in the biosphere. We have developed the producing technique of polymer raw materials from lignin-derived aromatic compounds, which were obtained when lignin is subjected to chemical decomposition, by utilizing microbial function to converge on a single intermediate. We have previously reported the production of β-ketoadipic acid (KA) from lignin-derived aromatic monomers by utilizing the metabolism of *Sphingobium* sp.SYK-6 and *Pseudomonas putida* KT2440. KA is a novel platform chemical which has a structure similar to that of adipic acid, a raw material for nylon 66, and holds a carbonyl group at the beta position that generally shows high reactivity due to nucleophilicity. However, KA production from vanillin, which is known as a fermentation inhibitor, efficiently in a high yield was not accomplished. On the other hand, high levels of vanillin are contained in extracts obtained when lignocellulose is subjected to alkaline oxidation. In this study, we succeeded in producing KA from vanillin at 10 g or more per L of culture solution, by investigating optimum addition rate of it. We are currently carrying out production of KA from Japanese cedar extracts subjected to alkaline oxidation. It will also be presented in this symposium.

lignin, bioreactor, ß-ketoadipic acid

発表責任者：鈴木　悠造（syuzo6@ffpri.affrc.go.jp）

講演番号：2C06-07
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 13:00～ ミーティングルーム C

マイクロ波化学反応によるサトウキビバガスからの抗ウイルス活性リグニンの生産
Production of antiviral lignin from sugarcane bagasse by microwave chemical reaction

○木村 智洋[1]、李 瑞波[1]、應田 涼太[3]、西村 裕志[1]、藤田 尚志[2]、渡辺 隆司[1]([1]京大生存研、[2]京大ウイルス・再生研、[3]北大医)
○ Chihiro Kimura[1], Ruibo Li[1], Ryota Ouda[3], Hiroshi Nishimura[1], Takashi Fujita[2], Takashi Watanabe[1] ([1]RISH, Kyoto Univ., [2]inFront, Kyoto Univ., [3]Hokkaido Univ.)

木質バイオマスを原料とするバイオリファイナリーを社会実装するためには、糖の利用と同時にリグニンを高付加価値利用することが重要である。また、地球温暖化や人や物の移動のグローバル化により病原性ウイルスの蔓延が深刻化している。これらを背景に、本研究では、バイオマスからウイルスの増殖を抑制するリグニンの生産に取り組んだ。酸またはアルカリを触媒とした様々な溶媒系でサトウキビの搾りかす（バガス）をマイクロ波反応に供し、生成物の脳心筋炎ウイルス（EMCV）に対する増殖抑制活性を測定した。その結果、硫酸を含む水グリセロール混合溶媒において 200°C でバガスをマイクロ波分解することで、細胞毒性が極めて低く強い抗ウイルス活性を有する物質を生産できることを見出し、活性成分を精製した。構造解析の結果、この活性物質は天然型構造が壊れ縮合型構造が生成したリグニンであることが示された。温和な条件で分解すると天然型のリグニン構造を保持するが、抗ウイルス活性は非常に低いことから、この構造変換が抗ウイルス活性を誘導していると考えられた。我々はさらに、この抗ウイルス活性リグニンが EMCV と直接的に接触することで、ウイルス感染の初期段階を阻害していることを明らかにした。

For social implementation of lignocellulosic biorefinery, conversion of lignin into value-added products are important in addition to utilization of carbohydrates. Global warming and globalization of transportation threaten our life by pandemic of pathogenic virus. This prompted us to study production of antiviral lignin from sugarcane bagasse, one of the most abundant lignocellulosic agricultural residues. As a result of screening of acidic and alkaline microwave reactions with different solvents, we found that antiviral lignin was produced by acidic microwave solvolysis in aqueous glycerol at 200°C. The antiviral compounds strongly inhibited encephalomyocarditis virus (EMCV), a non-enveloped positive single-stranded RNA virus, without cytotoxicity. When the bagasse was decomposed at lower temperatures, the products retained native lignin structure but exhibited very weak antiviral activity, indicating that the structural alteration of lignin induced the antiviral activity. We also found that the antiviral lignin interrupted early step of viral infection by direct contact with the virion.

biomass, antiviral agent, lignin

講演番号：2C06-08
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 13:00～ ミーティングルーム C

草食性陸ガニのリグニン類縁体酸化酵素群の解析

Lignin oxidation activities of herbivorous land crabs, *Chiromantes haematocheir* and *C. dehaani*

○三宅 克英[1]、安部 水葉[1]、小川 晃史[1]、下村 真司[1]、坂本 大樹[1]、馬場 保徳[2]([1]名城大理工、[2]石川県大資源研)
○Katsuhide MIYAKE[1], Mizuha Abe[1], Akifumi Ogawa[1], Shinji Shimomura[1], Daiki Sakamoto[1], Yasunori Baba[2] ([1]Meijo Univ., [2]Ishikawa Pref. Univ.)

【背景及び目的】天然の原生林と海が接した海岸林に生息するアカテガニやクロベンケイガニなどの陸ガニ類は、海岸森林バイオマスの分解者として、海と森の間の物質循環に大きな役割を果たしている。これらの陸ガニ類は落ち葉や木片を食料として利用することが報告されている。本研究の目標は、これまで省みられることのなかった陸ガニ類のバイオマス分解能力を解析、同定、抽出し、生物工学的な応用を可能にすることである。これまでの生態観察から、このカニは落ち葉のような柔らかいバイオマスだけでなく、固い切り株なども食料にしている可能性があり、バイオマス有効利用のボトルネックとなっている難分解性リグニン類の分解能力を持っているものと期待している。今回はリグニン類分解活性の指標としてグアヤコール酸化活性および 2, 6-ジメトキシフェノール（2,6-DMP）酸化活性に着目し、この活性の特徴を解析するとともに、全 RNA-seq 解析を行うことによって、遺伝子の単離も試みた。

【結果及び考察】アカテガニとクロベンケイガニを採集し、解剖後、肝臓と膵臓の機能を持つといわれている中腸腺、胃、腸を採取し、粗酵素液を調製した。リグニン分解活性としてはグアヤコール酸化活性に着目し、各個体の活性を調べたところ、主に中腸腺から検出されることが判明した。またこの活性はアカテガニにおいてはオスよりもメスで高頻度に検出され、クロベンケイガニではほぼ全ての個体から強い活性が検出された。これらの結果はこの活性が陸ガニ類の植食性の強さと強い関連性を持っていることを示していた。2,6-DMP 酸化活性も幾つかの個体から検出されたが、その挙動からグアヤコール酸化活性を示す酵素とは異なる酵素によって反応されている。アカテガニの RNA-seq の解析から、リグニン分解酵素として知られるラッカーゼ遺伝子を複数見出し、そのうち最も発現量の多い酵素を大腸菌に生産させて活性を解析した。その結果、この酵素は主に 2, 6-DMP 酸化活性を担っていることが明らかとなった。

The land crabs, *Chiromantes haematocheir* (Akate-gani) and *C. dehaani* (Kurobenkei-gani) inhabit seaside forests in Japan. The crabs mainly consume plant material and its detritus. Therefore, they are expected to possess the ability to degrade the major components of biomass, cellulose and lignin in order to digest plant materials. In this study, we analyzed biomass-degrading activities of the land crabs, especially guaiacol oxidation activity, which seems to be related to lignin degradation. Cellulase activity was detected from almost all gut samples including the stomach, midgut gland and intestine of all dissected crabs. Conversely, high guaiacol oxidation activity was detected in the midgut gland of all *C. dehaani* and several female *C. haematocheir* crabs. This is consistent with a previous study showing that female crabs were more herbivorous than male crabs were and observation that *C. dehaani* crabs are more herbivorous than *C. haematocheir*. Guaiacol oxidation activity might play an important role in the herbivorous behavior of land crabs.

A *de novo* transcriptome assembly in midgut glands of two *C. haematocheir* crabs was performed by using RNA sequencing. The highly expressed laccase cDNA was amplified and introduced into a bacterial expression vector. The purified laccase showed significant oxidation activities against 2,6-dimethoxyphenol and ABTS. This result suggested that this enzyme functions for degradation or modification of lignin in midgut gland of the herbivorous land crab.

land crab, lignin, laccase

発表責任者：三宅克英（miyake@meijo-u.ac.jp）

講演番号：2C06-09
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 13:00～ ミーティングルーム C

Acinetobacter 属細菌によるリグニンモデル化合物のエーテル結合の切断

Cleavage of ether bond in a lignin model compound by an *Acinetobacter* strain

○大谷 早紀[1]、羽部 浩[2]、古屋 俊樹[1] ([1]東京理科大院・理工、[2]産総研・環境管理)
○Saki OYA[1], Hiroshi HABE[2], Toshiki FURUYA[1] ([1]Fac. Sci. Tec., Tokyo Univ. Sci., [2]EMRI, AIST)

【背景・目的】原油由来の芳香族化合物は化学製品の合成原料などに利用されているが、原油は有限であり将来的に枯渇してしまう恐れがある。そこで近年、バイオマス資源のリグニンが芳香族化合物の供給源として注目されている。リグニンはモノリグノールと呼ばれる芳香族化合物が酸化重合した高分子化合物であり、多くのエーテル結合が含まれている。その中でも β-*O*-4 アリルエーテル結合が最も多く含まれており、この結合を切断できればリグニンの低分子化が可能になると考えられる。我々はこれまでに、リグニンの β-*O*-4 アリルエーテル結合に対するモデル化合物として 2-フェノキシアセトフェノン（2-PAP、図 1）を用い、エーテル結合切断活性を指標とした探索により当該活性を示す候補微生物を 8 株取得し、属種同定を行った[1)]。本研究では、高い変換活性を示した *Acinetobacter* sp. TUS-SO1 株について、変換産物の同定と機能解析を実施した。

【方法・結果】TUS-SO1 株の菌体と 2-PAP の反応液を HPLC および GC-MS により分析したところ、変換産物としてフェノールおよび 2-PAP のカルボニル基が還元された 2-フェノキシ-1-フェニルエタノールが同定された。さらに、これまでの研究では、2-PAP のエーテル結合の切断によりフェノールに加えてアセトフェノンが生成されると示唆されていたが[1)]、分析手法を再度検討し、HPLC-PDA によって分析したところ、アセトフェノンではなく安息香酸であることが判明した（図 1）。また、TUS-SO1 株は 2-PAP を炭素源として生育することはできないが、グルコースおよびバニリン酸を資化することができた。グルコースを炭素源として培養した TUS-SO1 株の菌体を回収し、1 mM の 2-PAP と反応させたところ、フェノールと安息香酸は反応を開始して数時間後から検出された。さらに詳細な検討を行った結果、切断に関与している酵素の発現は 2-PAP によって誘導されることが示唆された。

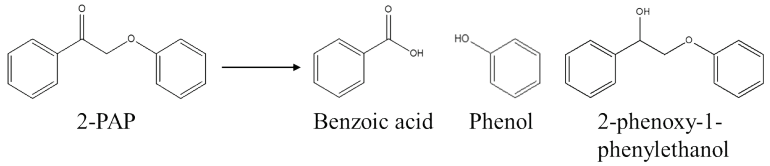


図 1　*Acinetobacter* sp. TUS-SO1 による 2-PAP の変換

1) 大谷早紀、羽部浩、古屋俊樹、2020 年度日本農芸化学会大会（講演番号：3C02p16）

We recently discovered *Acinetobacter* sp. TUS-SO1 that cleaves ether bond of 2-phenoxyacetophenone (2-PAP). In this study, we found that this strain convert 2-PAP to benzoic acid and phenol through cleavage of the ether bond.

Acinetobacter, biodegradation, ether bond

発表責任者：古屋俊樹（tfuruya@rs.tus.ac.jp）

講演番号：2C06-10
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 13:00～ ミーティングルーム C

酵母を用いた一貫バイオプロセスによるダンチクからのエタノール生産 条件の検討

Examination of ethanol production conditions from Arundo donax by integrated bioprocess using yeast

○菰田 恵菜、山中 優花、堀沢 栄（高知工科大学）
○Keina Komoda, Yuka Yamanaka, Sakae Horisawa (Kochi Univ. Technol.)

近年、地球温暖化防止などの観点から再生可能な生物資源を原料とする液体燃料が見直されている。現在はトウモロコシやサトウキビなどを原料とするエタノール生産が主流であるが、食料との競合が問題である。したがって、食料と競合しないセルロース系原料を用いたエタノールを生産方法の確立が必須であるが、脱リグニンとセルロースの糖化の分のコスト削減が課題である。そこでコスト削減のための同一の反応槽で脱リグニン、糖化、発酵を行う一貫バイオプロセス(CBP)の適用と、発酵阻害物発生を抑制するための生物処理を基本とすることにした。本研究ではエタノール発酵に有力な酵母と、セルロース分解、リグニン分解能を持つ糸状菌を使った複合微生物系を用いて一貫バイオプロセスを行うことを考えた。使用するセルロース系原料は温暖な地域の海辺周辺に生息するイネ科の多年草で繁殖力が高いダンチク(*Arundo donax*)を使用した。ダンチクはリグニンが比較的少ないという特徴があるので脱リグニンの工程を省略できると考えている。本研究ではダンチクを原料に、酵母と市販セルラーゼを同一の反応槽に入れて培養し、酵母 *Saccharomyces cerevisiae 株と Candida shehatae* 株のエタノール生産効率を評価した。両株ともグルコース、セルロース、ダンチクのすべての条件でエタノールを生産することが可能だとわかった

In recent years, liquid fuels made from renewable biological resources have been reviewed from the viewpoint of preventing global warming. Currently, ethanol production from corn and sugar cane is the mainstream, but competition with food is a problem. Therefore, it is important to establish a production method for ethanol using a cellulosic raw material that does not compete with food; however, the problem is to reduce the cost of delignification and saccharification. A consolidated bioprocess (CBP), where delignification, saccharification, and fermentation are conducted in the same reaction tank, can reduce costs, and apply biological treatment to suppress the generation of fermentation inhibitors. In this study, we examined the CBP using yeast, which is influential in ethanol production, and a complex microbial system using filamentous fungi with cellulose decomposition and lignin degradation. Giant reed (*Arundo donax*), perennial grass of the Gramineae family that lives around the seaside in warm regions and has high fertility, was used as raw material. Since the giant reed has a relatively low lignin content, the lignin removal step was thought to be unnecessary. In this study, yeast and commercially available cellulase were cultured in the same reaction chamber put giant reed as raw material, and the ethanol production efficiency was evaluated. Both yeast strains tested were found to be able to produce ethanol under all conditions of glucose, cellulose and giant reeds.

bioethanol, consolidated bioprocessing, *Arundo donax*

発表責任者：堀沢　栄（horisawa.sakae@kochi-tech.ac.jp）

講演番号：2C06-11
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 13:00～ ミーティングルーム C

地下環境における木材生物分解に関与する微生物群集

Microbial communities structure involved in wood biodegradation in the underground environment

○岡野 大輝[1]、原 忠[2]、堀沢 栄[1] ([1]高知工科大学、[2]高知大)
○Daiki Okano[1], Tadashi Hara[2], Sakae Horisawa[1] ([1]Kochi Univ. Technol., [2]Kochi Univ.)

液状化対策のひとつとして杭の打設による地盤の安定化があげられる。中でも杭として丸太を用いる丸太打設液状化対策＆カーボンストック工法(LP-LiC 工法)は、環境親和性のある木材を使用するので、森林資源の活用、炭素貯蔵効果などの利点がある。LP-LiC 工法においては、丸太の耐久性評価が重要である。地下環境における木材劣化を評価し、耐用時間、適切な処理方法など提案したいと考えている。本研究では、地盤安定化のために地中に埋設された丸太の微生物劣化を検討するために、丸太および丸太周辺の土壌を深さ方向や性質ごとに採取し、微生物の検出を行った。

丸太サンプルは 50 年前に建物の杭基礎として地中に埋設されたもの 2 本とその比較のために 28 日間埋設したもの 1 本の計 3 本を採集した。丸太を引き上げた際にそれぞれの丸太の上部、中部、下部に付着していた土壌サンプルも採取した。これらの丸太と土壌について ITS および 16s rDNA を使ったメタゲノム 解析によって微生物の群衆構造を解析した。また、土壌サンプルの全炭素量、全窒素量について分析を行った。

細菌種の同定の結果、浅い深度では好気性細菌が優占で、深い深度では嫌気性細菌が優占していた。

One of the liquefaction countermeasures is to stabilize the ground by piling logs (LP-LiC method). Determining the guaranteed period of the log strength is important for this technology. In this study, to evaluate the deterioration of wood in the underground environment, microbial communities in the logs and soils around them were examined by DNA based methods.

Three logs were collected: two of them had been buried underground as pile foundations for 50 years and one had been buried for 28 days for comparison. The soil was collected from the top, middle, and bottom of each log were also collected when the logs were pulled up. The whole DNAs were extracted from these logs and soils and the 16s rDNA and the ITS region were amplified by PCR and sequenced by NGS. The contents of total carbon and nitrogen of the soil were also analyzed.

Results of bacterial community structure analysis showed that aerobic bacteria were dominant in the upper ground and anaerobic bacteria including Clostridia were dominant in the lower.

wood degradation, bacterial community structure, LP-LiC

発表責任者：堀沢　栄（horisawa.sakae@kochi-tech.ac.jp）

講演番号：2C06-12
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 13:00～ ミーティングルーム C

コリネ型細菌の代謝改変による医薬品原料プロトカテク酸の発酵高生産

Protocatechuate overproduction by *Corynebacterium glutamicum* via simultaneous engineering of native and heterologous biosynthetic pathways

○小暮 高久[1]、須田 雅子[1]、平賀 和三[1]、乾 将行[1,2] ([1]RITE、[2]奈良先端大・バイオ)
○Takahisa Kogure[1], Masako Suda[1], Kazumi Hiraga[1], Masayuki Inui[1,2] ([1]RITE, [2]NAIST)

【目的】植物性食材に多く存在するプロトカテク酸 (3,4-ジヒドロキシ安息香酸、PCA) は、抗癌活性や抗炎症活性を含む様々な薬理活性を有することが知られ、医薬品原料として有望である。PCA は植物からの抽出によって得られるが、その生産効率や収量は低い。そこで本研究では、有用工業微生物 *Corynebacterium glutamicum* の代謝改変により、糖原料からの PCA 発酵高生産菌の開発を行った。
【方法と結果】シキミ酸やキナ酸の資化能を有する *C. glutamicum* は、それらの異化代謝中間体の 3-デヒドロシキミ酸 (DHS)を内因性の DHS デヒドラターゼにより PCA に変換する。一方、コリスミ酸を 4-ヒドロキシ安息香酸(4-HBA)に変換する異種由来酵素を本菌に発現させることで、内因性の 4-HBA 水酸化酵素による 4-HBA の PCA への変換を介した PCA 生産も可能である。本研究では、これら 2 種の PCA 生産経路のいずれか一方の利用、または両経路の同時利用により糖から PCA を生産可能な 3 種のプラスミドフリー菌株を染色体ベースの遺伝子改変を介して構築し、各菌株の PCA 生産能を比較した。その結果、2 種の PCA 生成経路を同時利用する菌株が最大の生産濃度に到達し、増殖非依存型セル反応においてグルコースを原料として 82.7 g/L の PCA 生産を 32 時間で達成した(1)。
(1) Kogure T. et al. Metab. Eng. 2020 (in press).

【Purpose】Protocatechuic acid (3, 4-dihydroxybenzoic acid, PCA) is a natural aromatic compound valuable as a pharmaceutical raw material owing to its diverse pharmacological activities. In this study, we developed *Corynebacterium glutamicum* strains overproducing PCA from renewable sugars via metabolic engineering.
【Methods and Results】*C. glutamicum* can form PCA from dehydroshikimate (DHS) as a key intermediate in a native pathway to assimilate shikimate/quinate. PCA can also be formed via an alternate pathway extending from chorismate by introducing heterologous chorismate pyruvate lyase that converts chorismate into 4-hydroxybenzoate (4-HBA), which is subsequently converted into PCA catalyzed by endogenous 4-HBA 3-hydroxylase. In this study, we generated three plasmid-free *C. glutamicum* strains overproducing PCA based on the markerless chromosomal recombination by engineering each or both of those two PCA-biosynthetic pathways combined with the extensive engineering of the host metabolism and compared their PCA productivities. In the growth-arrested cell reaction, a strain simultaneously utilizing both DHS and 4-HBA pathways achieved the highest reported PCA productivity of 82.7 g/L from glucose after 32h (1).

Protocatechuic acid, *Corynebacterium glutamicum*, Aromatic compound

講演番号：2C06-13
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 13:00～ ミーティングルーム C

大腸菌を宿主とした電子分岐型[FeFe]ヒドロゲナーゼの異種発現と水素生産

Heterologous expression and hydrogen production of an electron bifurcating [FeFe]-hydrogenase in *Escherichia coli* as a host

○清水 哲[1]、寺本 陽彦[1]、乾 将行[1,2] ([1]RITE、[2]奈良先端大・バイオ)
○Tetsu SHIMIZU[1], Haruhiko TERAMOTO[1], Masayuki INUI[1,2] ([1]RITE, [2]NAIST)

【目的】我々は大腸菌を用いたバイオマス由来糖類からの水素生産における収率向上を目指し、同菌が水素生産に利用できない NADH を有効利用できる新規水素生成酵素の探索を進めている。本研究では、超高熱性細菌 *Thermotoga maritima* において同定されている NADH とフェレドキシンの両方を使って水素を生産できる電子分岐型[FeFe]ヒドロゲナーゼに着目し、常温性細菌の *Desulfobulbus propionicus* のゲノム中に見出した同酵素 3 量体のホモログ（*Dp*HydABC）の大腸菌における発現について検討した。
【方法と結果】*Dp*HydABC に加え、*D. propionicus* 由来[FeFe]ヒドロゲナーゼ成熟化因子ホモログ（*Dp*HydEFG）の発現用プラスミドを構築し大腸菌 BL21（DE3）Δ*iscR* 株に導入した。宿主が水素生成酵素活性を欠損しているのに対し、*Dp*HydABCEFG 導入株の細胞抽出液中に顕著な同酵素活性が検出された。また、密閉培養瓶気相中から *Dp*HydABCEFG 導入株による微量の水素生産が検出された。この株をベースに、フェレドキシン還元経路の強化と NADH 利用競合経路（コハク酸、乳酸、エタノール生産経路）の破壊の影響を調べたところ、水素生産量が 2～40 倍上昇したことから、大腸菌で発現させた *Dp*HydABC が NADH とフェレドキシンを電子供与体として利用し水素を生産できることが示唆された。

[Purpose] We are working on development of a process for highly efficient production of bio-hydrogen from cellulosic biomass by using genetically engineered *Escherichia coli* strains. In this study, we focused on the electron-bifurcating [FeFe]-hydrogenase complex (HydABC) capable of producing hydrogen from both ferredoxin and NADH as electron donors, the enzyme which has been identified in a hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*. We identified a homolog of HydABC in the genome of a mesophilic bacterium *Desulfobulbus propionicus* (*Dp*HydABC), and heterologous expression of *Dp*HydABC in *E. coli* was examined.
[Methods and Results] *Dp*HydABC and putative [FeFe]-hydrogenase maturation factors from *D. propionicus* (*Dp*HydEFG) were co-expressed in *E. coli* BL21 (DE3) Δ*iscR* as the host. High hydrogenase activity was detected in the strain expressing *Dp*HydABCEFG, and hydrogen production was detected in the head space of the sealed vial during culturing. Engineering this strain by enhancing reduction of ferredoxin and disruption of mixed-acid fermentation pathways oxidizing NADH resulted in 2-40-fold increases in hydrogen production, suggesting that *Dp*HydABC can utilize both NADH and ferredoxin for hydrogen production.

hydrogen production, electron bifurcation, hydrogenase

発表責任者：乾将行（inui@rite.or.jp）

講演番号：2C06-14
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 13:00～ ミーティングルーム C

エチレングリコール資化性菌の探索と代謝機構の解析

Investigation of ethylene glycol assimilating bacteria and analysis of metabolic pathway

○鈴木 快[1,2]、清水 哲[2]、乾 将行[1,2]（[1]奈良先端大・バイオ、[2]RITE）
○Kai SUZUKI[1,2], Tetsu SHIMIZU[2], Masayuki INUI[1,2] ([1]NAIST, [2]RITE)

【目的】近年、生分解性プラスチックの原料としてグリコール酸の需要が高まっている。バイオマスから製造可能なエチレングリコール（EG）からバイオプロセスによりグリコール酸を生産出来れば、従来の製造法に対し環境負荷の低減が期待される。本研究では、細菌による EG 代謝中間体としてグリコール酸が生成することに着目し、新規 EG 資化性菌の探索及び EG を原料としたグリコール酸生産に適した新規代謝酵素遺伝子の取得を試みた。
【方法と結果】当研究室保存菌株を対象とし、EG を炭素源とした培地で増殖できる株を選抜した結果、*Rhodococcus jostii* RHA1 株が EG を資化できることを見出した。そこで RHA1 株の推定グリコール酸酸化酵素遺伝子（*glcD2*）を破壊した株を作製したところ、EG を炭素源として生育できなくなった。また同破壊株に *glcD2* 発現プラスミドを導入した相補株は、野生株と同レベルまで EG を炭素源とした生育が回復した。以上の結果から RHA1 株において EG がグリコール酸を経由して資化されることが明らかとなった。現在 RHA1 株で EG からグリコール酸への変換を担う酵素遺伝子について解析を進めており、その結果についても発表予定である。
［Purpose］In recent years, glycolic acid is in high demand as a monomer for biodegradable plastics. If glycolic acid can be produced from ethylene glycol (EG), which can be produced from biomass, via bioprocess, it would be superior to the conventional manufacturing methods in a view of sustainability. Since previous studies have shown that glycolic acid is formed as an intermediate of EG metabolism by bacteria, we searched for new EG assimilating bacteria in order to obtain novel metabolic genes suitable for production of glycolic acid from EG.
[Methods and Results] As a result of screening for preserved bacterial stocks in our laboratory, we found that *Rhodococcus jostii* RHA1 can assimilate EG as a sole carbon source. We deleted a putative glycolate oxidase gene (*glcD2*) in *R. jostii* RHA1, and we observed that the *glcD2* mutant is incapable of growth with EG. Furthermore, introduction of a *glcD2* expression plasmid into the *glcD2* mutant restored ability to grow with EG to the similar level as the wild-type strain. These results indicate that EG is assimilated via glycolic acid in *R. jostii* RHA1. We are currently analyzing genes responsible for the conversion of EG to glycolic acid in *R. jostii* RHA1, results of which will be also presented.

glycolic acid, biodegradable plastics, biomass

発表責任者：乾 将行（inui@rite.or.jp）

講演番号：2C06-15
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 13:00～ ミーティングルーム C

組換え *Ralstonia eutropha* によるポリヒドロキシアルカン酸ブロック共重合体の生合成
Biosynthesis of polyhydroxyalkanoates with block sequence by recombinant *Ralstonia eutropha*

○石原 静流[1]、折田 和泉[1]、松本 謙一郎[2]、福居 俊昭[1] ([1]東工大生命理工、[2]北大院工)
○Shizuru ISHIHARA[1], Izumi ORITA[1], Ken'ichiro MATSUMOTO[2], Toshiaki FUKUI[1]
([1]Tokyo Tech., [2]Hokkaido Univ.)

【背景と目的】ポリヒドロキシアルカン酸 (PHA)は生分解性に優れる高分子素材であり，多様な物性の PHA 素材の開発が望まれている．微生物合成された共重合 PHA はモノマー配列の規則性が低いランダム共重合体であるが，近年，*Ralstonia eutroha* および *Aeromonus caviae* に由来する重合酵素 PhaC のキメラタンパク質 $PhaC_{AR}$ を発現した組換え大腸菌は 2-ヒドロキシブタン酸 (2HB)添加培養で 3-ヒドロキシブタン酸 (3HB)と 2HB からなるブロック共重合体が生合成されることが報告された (Matsumoto et al., 2018)．一般にブロック共重合体はミクロ相分離等の特徴的な構造をとり，ランダム共重合体とは異なる物性を示す．本研究では PHA 生産能の高い *R. eutropha* に $PhaC_{AR}$ を導入し，その PHA 生合成能を検討した．
【方法と結果】*R. eutropha* 染色体上の *phaC* を相同性組換えにより $phaC_{AR}$ に置換した．さらに，Thr 生合成経路を経由した 2HB-CoA 供給経路の構築のため，*Clostridium difficile* 由来乳酸脱水素酵素および CoA 転移酵素を PHA 顆粒結合タンパク質遺伝子の下流に挿入した．作製した組換え株をグルコースを単一炭素源として培養したところ，ごく少量ではあるが 2HB を含有した共重合体を生合成した．2HB 添加培養を行ったところ，強い生育阻害が観察されたが Val またはピルビン酸の添加により回避できることを見出し，2HB 添加により Val 生合成が抑制されている可能性が高いことを示した．2HB と Val を添加したグルコース-ピルビン酸混合炭素源培地において、作製株は 2HB ユニットを約 8 mol%含有した共重合体を蓄積した。NMR 解析により，生合成された PHA はブロック性の高い共重合体であることが強く示唆された．

Polyhydroxyalkanoates (PHAs) are promising biodegradable polyesters. Recently, it was reported that a PHA block copolymer composed of 3-hydroxybutyrate (3HB) and 2-hydroxybutyrate (2HB) was synthesized by *Escherichia coli* harboring $PhaC_{AR}$, a chimeric PHA synthase from *Ralstonia eutropha* and *Aeromonas caviae*. In this study, *R. eutropha* having $phaC_{AR}$ on chromosome was constructed and the PHA biosynthesis properties were investigated. When the recombinant strain was cultivated on mixed carbon sources of glucose and pyruvate with supplement of 2HB and Val, PHA containing about 8 mol% 2HB was accumulated. NMR analysis of the extracted PHA strongly suggested the block sequence of 3HB and 2HB units.

PHA, biodegradable polyesters, *Ralstonia eutropha*

発表責任者：石原静流（ishihara.s.ak@m.titech.ac.jp）

講演番号：2C06-16
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 13:00～ ミーティングルーム C

メタノール資化性菌内での C_1 化合物資化代替経路の構築

Establishment of alternative pathway for assimilation of C_1 compounds in methylotrophic bacterium

○折田 和泉[1]、平林 翼[1]、新田 克章[2]、福崎 英一郎[2]、福居 俊昭[1] ([1]東工大生命理工、[2]阪大院工)
○Izumi ORITA[1], Tsubasa HIRABAYASHI[1], Katsuaki NITTA[2], Eiichiro FUKUSAKI[2], Toshiaki FUKUI[1] ([1]Tokyo Tech., [2]Osaka Univ.)

【背景と目的】メタノール資化性菌 *Methylorubrum extorquens* はメタノールを単一炭素源として微生物産生の生分解性プラスチックであるポリヒドロキシアルカン酸（PHA）を生合成する。本菌はメタノール酸化によって生じたギ酸をセリン回路によって固定し、C_1 受容体であるグリオキシル酸をエチルマロニル-CoA (EMC) 経路によって再生する。従って、セリン回路-EMC 経路は本菌のメタノール中央代謝経路として機能する。EMC 経路上には PHA の前駆体となる CoA チオエステルが存在するが、これを PHA 生産に利用するとメタノール生育能が著しく低下することが問題となっていた。本研究では、メタノール生育と有用物質生産を両立させるために、セリン回路-EMC 経路に依存しない C_1 化合物資化代替経路を *M. extroquens* に構築することを目指した代謝改変を行った。
【方法と結果】C_1 化合物資化の代替経路としてホルムアルデヒドをリブロース-5-リン酸に固定するリブロースモノリン酸経路に着目した。EMC 経路の鍵酵素遺伝子を破壊したメタノール生育能欠失株内でリブロースモノリン酸経路の鍵酵素遺伝子を発現したところ、組換え株において遺伝子産物の有意な活性を検出したがメタノール単一炭素源では生育しなかった。この組換え株をメタボローム解析に供した結果、コントロール株と比較して各種鎖長の糖リン酸の細胞内濃度が顕著に低かった。また、グリセルアルデヒド-3-リン酸 (GAP) がコントロール株においても検出されず、GAP 供給強化の必要性が示唆された。そこでリブロースモノリン酸経路鍵酵素遺伝子とともに Entner-Doudoroff 経路上の酵素遺伝子を発現するためのプラスミドを構築し EMC 経路破壊株に導入した。さらに、ホルムアルデヒドをキシロース-5-リン酸に固定して GAP とジヒドロキシアセトンに変換するメタノール資化性酵母のキシロースモノリン酸経路鍵酵素遺伝子の発現株を構築した。いずれの発現株でもメタノール単一炭素源での生育はみられなかったが、メタボローム解析の結果、各種糖リン酸濃度に変化がみられた。これらの結果から、導入した遺伝子は機能発現しているものの、糖リン酸代謝のさらなる強化が必要であることが示された。

This study aims to establish alternative pathway for assimilation of C_1 compounds in methylotrophic bacterium *Methylorubrum extorquens* in which central metabolic pathway competes with production of valuable compounds. We introduced the genes for key enzymes of the other C_1 assimilation pathway in methylotrophy-deficient *M. extorquens*. Although no methylotrophic growth was observed in recombinant strains, metabolome profiles showed significant change of various sugar phosphates, suggesting the functional expression of introducing genes.

Methylotroph, Methanol, PHA

発表責任者：折田和泉（iorita@bio.titech.ac.jp）

講演番号：2C06-17
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 13:00～ ミーティングルーム C

水素細菌およびメチロトローフにおける転写制御スイッチの確立

Transcriptional switch functional in hydrogen-oxidizing and methylotrophic bacteria

○福居 俊昭[1]、平山 歩夢[1]、折田 和泉[1]、梅野 太輔[2] ([1]東工大生命理工、[2]千葉大院工)
○Toshiaki Fukui[1], Ayumu Hirayama[1], Izumi Orita[1], Daisuke Umeno[2] ([1]Tokyo Tech, [2]Chiba Univ.)

【目的】微生物による有用物質の効率的生産には物質生産方向と細胞増殖方向の代謝フラックス制御が重要である。一方、近年の合成生物学研究では野生型 (WT) リプレッサーを用いて誘導剤添加により標的遺伝子の転写を誘導する ON スイッチに加え、逆表現型 (RP) の変異リプレッサーを用いて転写を抑制する OFF スイッチが開発されている。

微生物が生産するポリヒドロキシアルカン酸 (PHA) はその高い生分解性から環境調和型高分子材料として期待されている。PHA 生産代謝においても転写スイッチによる制御は有効と考えられるが、PHA 生産菌で使用できるツールは開発途上である。本研究では PHA を多量に蓄積する水素細菌 *Ralstonia eutropha*、メタノールから PHA を生産するメチロトローフ *Methylorubrum extorquens* で機能する転写制御スイッチの確立を目指した。

【方法】GFP 発現ベクターの *gfp* 上流にオペレーターを挿入し、リプレッサー遺伝子 (WT または RP) を導入した。リプレッサーは *Escherichia coli* 由来のコリン誘導性 BetI とアンヒドロテトラサイクリン (aTc) 誘導性 TetR を使用し、Bet ON/Bet OFF スイッチおよび Tet ON/Tet OFF スイッチを作製した。形質転換体は誘導剤非添加条件と添加条件で培養し、GFP 蛍光強度から発現制御を評価した。

【結果】*R. eutropha* に Bet ON スイッチを導入した株では、*E. coli* 由来のコリン特異的トランスポーターを共発現させることでコリン添加による GFP の発現誘導が観察された。Tet ON スイッチではリプレッサー遺伝子の配置が異なる複数の構成について検討したところ、*Klebsiella aerogenes* 由来のテトラサイクリン耐性遺伝子群を用いて構築した Tet ON スイッチにおいて aTc 添加による発現誘導が良好であった。

M. extorquens の Bet ON スイッチ導入株ではコリン添加に伴う発現誘導が見られなかったが、オペレーター配列にランダム変異を導入したライブラリーから、BetI(WT)との親和性が低下することで機能する Bet ON スイッチを取得した。Tet ON スイッチおよび Bet OFF スイッチでは、誘導剤添加に伴う GFP の発現誘導と発現抑制がそれぞれ観察された。さらに PHA 共重合体生合成における鍵酵素遺伝子の発現制御に TetON スイッチの適用を試みた。

Transcriptional switch is useful for metabolic regulation with the aim of production of useful compounds. In this study, two kinds of transcriptional switch working in polyhydroxyalkanoate-producing bacteria *Ralstonia eutropha* and *Methylorubrum extorquens* were established and evaluated.

Transcriptional switch, *Ralstonia eutropha*, *Methylorubrum extorquens*

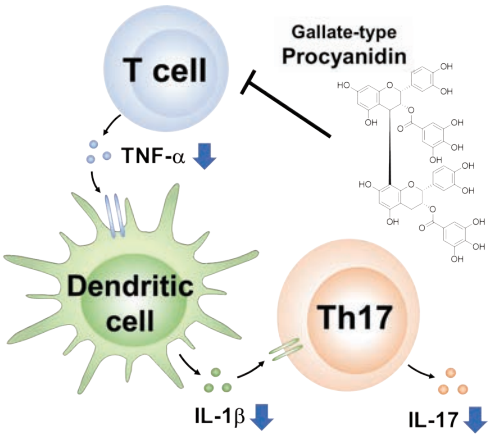
発表責任者：福居俊昭（tfukui@bio.titech.ac.jp）

講演番号：2D02-01
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 09:30～ ミーティングルーム D

ガレート型プロシアニジンによる IL-17 産生抑制メカニズムの解析

The inhibitory mechanism on gallate-type procyanidin of IL-17 production by T cells

○遠藤 勝紀、澤 陶有子、田中 佑奈、浅見 拓哉、松井 莉奈、真壁 秀文、田中 沙智（信州大学）
○Katsunori ENDO, Toko SAWA, Yuna TANAKA, Takuya ASAMI, Rina MATSUI, Hidefumi MAKABE, Sachi TANAKA (Shinshu Univ.)



炎症性疾患や自己免疫疾患の病態改善には、過剰な免疫反応を促進する T 細胞を適切に制御することが重要である。特に、Th17 細胞が産生する IL-17 は炎症反応を惹起し、様々な自己免疫疾患の悪化に関与することが報告されている。これまでに我々は、ポリフェノール化合物の一つであるガレート型プロシアニジンに着目し、その免疫調節作用について検討した結果、ガレート型プロシアニジンによって IL-17 産生が抑制されることを見出している。そこで、本研究ではマウス脾臓細胞を用いて IL-17 産生の抑制メカニズムを精査したところ、ガレート型プロシアニジンは IL-17 に加え、T 細胞の TNF-α および樹状細胞の IL-1β の産生を抑制することが明らかになった。また、単離した T 細胞と骨髄由来樹状細胞（BMDC）を共培養させることで、ガレート型プロシアニジンが作用する細胞を検討した。その結果、ガレート型プロシアニジンで処理した T 細胞を BMDC と共培養した際に、TNF-α、IL-1β、IL-17 の産生が有意に抑制された。以上の結果から、ガレート型プロシアニジンは T 細胞に作用することで TNF-α を抑制し、樹状細胞由来 IL-1β の抑制を介して、IL-17 産生を低下させることが示唆された。今後は、自己免疫疾患モデルマウスを用いて、ガレート型プロシアニジンの IL-17 産生抑制を介した疾患予防効果について評価していきたい。

Modulating the abnormal T cell responses can be effective for the amelioration of inflammatory diseases. Gallate-type procyanidin could be an effective resource because this polyphenol has significant immunosuppressive effects. We have already found that gallate-type procyanidin markedly suppressed the production of interleukin-17 (IL-17) that facilitates inflammation. In this study, we researched the mechanism of suppressing IL-17 production through inhibiting interactions between immune cells. Gallate-type procyanidin suppressed the production of T cell-derived TNF-α and dendritic cell (DC)-derived IL-1β. In addition, CD4-DC co-culture experiments showed that the production of IL-17, TNF-α, and IL-1β was markedly inhibited in co-cultures of gallate-type procyanidin-pretreated $CD4^+$ T cells and DCs. Therefore, this study showed that gallate-type procyanidin first modulated TNF-α production by T cells and then suppressed IL-1β secretion from DCs, resulting in decreased IL-17 production. In future studies, we will investigate the functional effects of gallate-type procyanidin on IL-17-mediated pathologies using a mouse model.

Gallate-type procyanidin, T cell, Dendritic cell

発表責任者：田中 沙智（tanakasa@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：2D02-02
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 09:30～ ミーティングルーム D

マンノオリゴ糖による樹状細胞活性化機構に関する解析

Analysis of mechanism for dendritic cell activation by mannooligosaccharides

○鄭 廷宇[1]、LIN Yen-Ju[2]、佐分利 亘[3]、SCHUELKE Stefan[2]、戸田 雅子[1] ([1]東北大院農、[2]The Paul-Ehrlich-Institut、[3]北大院農)
○Ting Yu CHENG[1], Yen-Ju LIN[2], Wataru SABURI[3], Stefan SCHUELKE[2], Masako TODA[1] ([1]Tohoku Univ., [2]The Paul-Ehrlich-Institut, [3]Hokkaido Univ.)

マンノオリゴ糖は免疫機能性が期待される難消化性糖類である。本研究は免疫機能性を持つマンノオリゴ糖を同定し、その機能性発現の作用機序を解析することを目的とした。β-(1→4)-mannnobiose、β-(1→4)-mannnotriose、β-(1→4)-mannnotetraose、β-(1→4)-mannnopentaose、β-Man-(1→4)-Glc、β-Glc-(1→4)-Man、あるいは β-Man-(1→4)-GlcNAc で骨髄由来マウス樹状細胞 (bone marrow-derived murine dendritic cells: BMDC) を刺激したところ、特に β-Man-(1→4)-Man が顕著に細胞を活性化した。BMDC とオボアルブミン特異的 TCR トランスジェニックマウス OT-II 由来 CD4 陽性 T 細胞の共培養系において、β-Man-(1→4)-Man は抗原特異的 T 細胞応答を増強した。各種受容体阻害剤を用いた実験により、β-Man-(1→4)-Man は Toll-like receptor (TLR) 4 や Complement receptor (CR) 3 を介して BMDC を活性化することが明らかになった。また、β-Man-(1→4)-Man により濃度依存的に細胞のグルコース代謝と乳酸産生が促進され、ワールブルク効果が観察された。以上の結果から、β-Man-(1→4)-Man は免疫賦活性を持つオリゴ糖であり、その TLR4 や C3R を介した BMDC 活性化には解糖系の亢進が関与することが示唆された。本研究で得られた知見は、マンノオリゴ糖を用いた免疫機能性食品やワクチンアジュバントの開発に貢献するものである。

Mannooligosaccharides are expected to exhibit immune functionality. This study aimed at identifying mannooligosaccharide(s) with immunostimulatory capacity and elucidating a responsible mechanism for such a capacity. When we stimulated bone marrow-derived murine dendritic cells (BMDC) with β-Man-(1→4)-Man, β-Man-(1→4)-Man_2, β-Man-(1→4)-Man_3, β-Man-(1→4)-Man_4, β-Man-(1→4)-Glc, β-Glc-(1→4)-Ma, β-Man-(1→4)-GlcNAc, β-Man-(1→4)-Man induced the strongest cell activation. In a co-culture system of BMDC with $CD4^+$ T-cells isolated from ovalbumin-specific TCR transgenic OTII-mice, β-Man-(1→4)-Man enhanced T-cell responses to the antigen. Using putative receptor inhibitors, we found that Toll-like receptor (TLR) 4 and complement receptor (CR) 3 are involved in β-Man-(1→4)-Man-mediated BMDC activation. In addition, β-Man-(1→4)-Man promoted glucose metabolism and release of lactic acid in the cells. Our results indicated that (i) β-Man-(1→4) -Man possesses an immunostimulatory capacity, and (ii) promotion of glycolysis is involved in the activation of BMDC via TLR4 and C3R engagements. This study would contribute to develop immune boosting functional foods and a novel vaccine adjuvant.

immunofunction, oligosaccharides, Dendritic cells

発表責任者：戸田雅子（masako.toda.a7@dc.tohoku.ac.jp）

講演番号：2D02-03
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 09:30～ ミーティングルーム D

緑茶カテキン EGCG は骨髄性細胞の 67LR を介して肥満誘発性炎症および脂肪蓄積を抑制する

Green tea polyphenol EGCG attenuates obesity-induced inflammation and fat accumulation via 67LR in myeloid cells

○冨岡 玲乃、西岡 成汰、小原井 春香、村田 京介、福富 拓哉、山田 脩平、熊添 基文、藤村 由紀、立花 宏文（九大院農院・生機科）
○ Reno TOMIOKA, Seita NISHIOKA, Haruka KOBARAI, Kyosuke MURATA, Takuya FUKUTOMI, Shuhei YAMADA, Motofumi KUMAZOE, Yoshinori FUJIMURA, Hirofumi TACHIBANA (Kyushu Univ.)

【目的】緑茶カテキンの主成分である EGCG は、マクロファージ（MΦ）において 67-kDa ラミニン受容体 (67LR)を介して抗炎症作用を発揮する。また、MΦは肥満に伴う慢性炎症に深く関与することが知られている。そこで本研究では、MΦを含む骨髄性細胞特異的 67LR ノックアウトマウス(67LR-KO マウス)を用いて、食餌誘発性肥満に対する EGCG の効果および 67LR の関与を検討した。

【方法および結果】骨髄性細胞特異的 67LR-KO マウスを用いて、高脂肪高ショ糖食および EGCG 摂食試験を行った。その結果、肥満誘導による体重および脂肪重量の増加を EGCG は抑制したが、これらの作用は 67LR-KO マウスでは観察されなかった。続いて、睾丸周辺脂肪組織における遺伝子発現を次世代シーケンサー（Novaseq）にて包括的に解析したところ、EGCG 摂食により 635 種類の遺伝子発現が変動したが、そのうち 494 種類は 67LR-KO により変動が消失した。また、KEGG pathway 解析により、EGCG が 67LR 依存的に発現を低下させた遺伝子の多くは炎症経路に関連することが見出された。さらに、肥満の原因の一つとされる脂肪組織におけるMΦの浸潤を評価したところ、対照マウスでは EGCG の摂食によりMΦの浸潤が抑制されたのに対し、67LR-KO マウスでは EGCG による浸潤抑制作用が見られなかった。以上より、EGCG はMΦの 67LR を介して抗肥満作用および脂肪組織おける炎症抑制作用を発揮することが示された。

Green tea polyphenol EGCG exerts anti-inflammatory effect in macrophages through 67-kDa laminin receptor (67LR). Macrophages are deeply involved in chronic inflammation associated with obesity. In this study, we generated myeloid cell-specific 67-kDa laminin receptor knock out mice and investigated the effect of EGCG on diet-induced obesity and the involvement of 67LR in macrophages. Here, we showed that EGCG intake attenuated the HF/HS diet-induced body weight and adipose tissue weight increase. This activity of EGCG was canceled in 67LR-knock out mice. Moreover, EGCG changed 494 genes expression in epididymal adipose tissue via 67LR in macrophages. Many of genes downregulated by EGCG through 67LR were associated with inflammatory pathways. In addition, EGCG inhibited accumulation of macrophages in adipose tissue through 67LR in macrophages.

In conclusion, EGCG exerted anti-obesity activity by inhibiting inflammation of adipose tissue via 67LR in macrophages.

EGCG, 67LR, macrophage

講演番号：2D02-04
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 09:30～ ミーティングルーム D

腸管 M 細胞透過性を有する食品由来多糖の探索

The search for food-derived polysaccharides with intestinal M cell permeability

○近澤 未歩、湊 健一郎（名城大農）
○Miho CHIKAZAWA, Ken-ichiro MINATO (Meijo Univ.)

腸管は消化・吸収の場であることに加え、免疫応答の場としても重要であり、多数の免疫細胞が存在している。腸管免疫系は常に食事中の成分や腸内細菌などの外的な刺激を受け続けている。腸管の粘膜固有層やパイエル板には免疫細胞が存在し、これらの分子を識別して必要に応じた応答を行うことで、腸管内の恒常性を維持している。多糖は疾患予防や免疫機能亢進など、様々な生理活性を持つことが知られる。多糖やその代謝物の生理機能が着目されているが、作用メカニズムや腸管内での挙動などについては未解明な点が多い。

本研究では、多糖が腸管免疫系に作用し、腸管抗体の産生や恒常性維持に影響を与えることを予想し、これを明らかにすることを目的とした。M 細胞は腸管上皮に存在し、免疫器官であるパイエル板に微生物などの抗原を受け渡す作用を担う。M 細胞を透過する多糖が存在するのか明らかにするため、Raji 細胞との共培養により Caco-2 細胞の M 細胞への分化を誘導し、多糖の透過を ELISA により確認した。その結果、複数の多糖が透過性を有することが予想された。今後はアッセイ方法の確立と透過メカニズムの解析を行う予定である。

The intestinal tract is important not only as a place for digestion and absorption but also as a place for immune response, and a large number of immune cells are present. The intestinal immune system is constantly receiving external stimuli such as dietary components and intestinal bacteria. Immune cells are present in the lamina propria and Peyer's patches of the intestinal tract, and by responding to exogenous molecules as needed, homeostasis in the intestine is maintained.

Polysaccharides are known to have various physiological activities such as disease prevention and immunomodulatory effect. Nevertheless, there are still many unclear points about the physiological functions of polysaccharides and their metabolites, and their health effects are attracting attention.

We predicted that polysaccharides would affect the production of intestinal antibodies and the maintenance of homeostasis, and we aimed to clarify these issues. M cells exist in the intestinal epithelium and play a role in delivering antigens such as microorganisms to Peyer's patches. In order to clarify the existence of polysaccharides that permeate M cells, we induced differentiation of Caco-2 cells into M cells and searched for polysaccharides that permeate M cells.

polysaccharide, M-cell, gut immunity

発表責任者：近澤未歩（mchika@meijo-u.ac.jp）

講演番号：2D02-05
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 09:30～ ミーティングルーム D

ヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞の特性と食品機能解析への応用

Characteristics of small intestinal epithelial cells derived from human induced pluripotent stem cells and their applications for food function analysis

○今倉 悠貴[1]、美馬 伸治[1]、山﨑 奈穂[1]、岩尾 岳洋[2]、松永 民秀[2]、永田 幸三[1]、谷口 雅彦[1] ([1]富士フイルム株式会社、[2]名市大薬)
○Yuki IMAKURA[1], Shinji MIMA[1], Nao YAMAZAKI[1], Takahiro IWAO[2], Tamihide MATSUNAGA[2], Kozo NAGATA[1], Masahiko TANIGUCHI[1] ([1]FUJIFILM Corporation, [2]Nagoya City Univ.)

小腸は、食品の吸収・代謝を担う消化器官としての役割に加え、人体最大の免疫器官としても知られている。食品成分や腸内細菌が人体に及ぼす影響を解析し、その作用メカニズムを明らかにするためには、ヒト小腸の機能を再現した評価モデルが必要である。現在、ヒト小腸の代替モデルとして Caco-2 細胞や実験動物が用いられているが、各種トランスポーター・代謝酵素・受容体の発現量の違いや種差等により、ヒト生体との乖離が問題となっている。また近年、動物愛護の観点から、動物実験の代替となる評価モデルの開発が期待されている。そこで我々はヒト iPS 細胞から腸管上皮細胞を分化誘導し、既存のモデルよりもヒト生体に近い性質を有する *in vitro* モデルの構築を試みた。

まず、ヒト iPS 細胞から腸管上皮細胞への分化誘導方法を確立し、凍結細胞製品 F-hiSIEC™ を開発した。本細胞は、腸管上皮細胞のマーカーや、食品成分の吸収と代謝に関わるトランスポーター及び代謝酵素の mRNA 発現がヒト小腸とほぼ同等であった。また、iPS 細胞から分化誘導した複数のロット間において、安定したトランスポーター活性や代謝酵素活性を示した。そして、本細胞を用いることで、化合物の腸管吸収性を Caco-2 細胞よりも高い精度で予測できることが示された。興味深いことに、本細胞には食品成分の吸収・代謝を担う吸収上皮細胞に加えて、腸管免疫に関わる杯細胞、内分泌細胞、パネート細胞、M 細胞、タフト細胞等も含まれていた。また、本細胞は Toll 様受容体（TLR）や脂肪酸受容体をヒト小腸同等に発現しており、それぞれのリガンドに応答したサイトカイン発現量の変動を評価できることが示された。

本細胞はヒト小腸に近い性質を有し、食品成分の吸収・代謝や、腸内細菌及びその代謝物による免疫応答等を評価できるモデルとして、食品の機能解析や動物実験削減に寄与するものと期待される。

In order to analyze the effects of food and intestinal bacteria, we developed human iPS cell-derived small intestinal epithelial cells (F-hiSIEC™) for an *in vitro* human small intestinal model. F-hiSIEC™ showed that the mRNA expressions of metabolic enzymes and transporters related to nutrients were similar to the adult small intestine. By using F-hiSIEC™, immune responses via toll-like receptors and short-chain fatty acid receptors could be evaluated.

These cells are expected as an ideal material for the alternative method for evaluating digestion and absorption of food ingredients and immune response by intestinal bacteria.

small intestinal epithelial cell, functional food, gut microbiota

発表責任者：今倉悠貴（yuki.imakura@fujifilm.com）

講演番号：2D02-06
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 09:30～ ミーティングルーム D

Lactobacillus paracasei K71 の経口摂取によるスギ花粉アレルギー症状の緩和効果

The ameliorative effect of *Lactobacillus paracasei* K71 on nasal allergy signs and symptoms caused by Japanese cedar pollen.

○三原 敏敬[1]、畑 実里[2]、吉澤 梓織[2]、山本 佳奈[1]、杉本 淑惠[1]、内山 公子[1]、城 斗志夫[2]、原 崇[2] ([1]亀田製菓、[2]新潟大農)
○ Toshihiro MIHARA[1], Misato HATA[2], Shiori YOSHIZAWA[2], Kana YAMAMOTO[1], Yoshie SUGIMOTO[1], Kimiko UCHIYAMA[1], Toshio JOH[2], Takashi HARA[2] ([1]Kameda Seika Co., Ltd., [2]Fac. Agric., Niigata Univ.)

酒粕由来の乳酸菌 *Lactobacillus paracasei* K71（LpK71）は抗アレルギー作用が期待されている[1)]。本研究では、LpK71 摂取によるヒトスギ花粉症症状の緩和効果とスギ花粉アレルギーモデルマウスに及ぼす影響について検討した。日本スギ花粉特異的 IgE 陽性の被験者 50 名に対し、ランダム化二重盲検プラセボ対照並行群間比較試験を行った結果、49 名が試験を完了し、1 名除外基準に該当したため、48 名で有効性解析を実施した。熱殺菌 LpK71（乾燥粉末 50 mg/day）もしくはプラセボ含有食品を 8 週間摂取後、花粉暴露施設内で症状を誘発し、花粉暴露中の 3 時間および帰宅後数日間のアレルギー症状を観察した。その結果、LpK71 摂取により花粉暴露中の鼻かみ回数と鼻づまりスコアが有意に改善した。花粉暴露後数日間の症状については、LpK71 摂取によりくしゃみ回数と喉の違和感のスコアが有意に改善した。BALB/c マウス（6 週齢，♀）に Cry j1 と水酸化アルミニウムゲルを腹腔内投与してスギ花粉アレルギーモデルマウスを作製し、熱殺菌 LpK71 摂取（0.05%混餌投与）が血中 IgE レベルと鼻掻き行動に及ぼす影響を調べた。熱殺菌 LpK71 投与により血中 IgE レベル亢進が抑制され、鼻への Cry j1 塗布により誘発される鼻掻き行動回数が低下する傾向が確認された。LpK71 は花粉症症状を緩和する効果が期待され，その機序として IgE 産生抑制が推察される。

Lactobacillus paracasei K71 (LpK71) isolated from sakekasu (sake lees) has been shown to possess anti-allergic activity [1)]. We conducted a randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel-group trial to determine the effect of LpK71 on allergic symptoms induced by Japanese cedar (JC) pollen. As a result, 8 weeks intake of heat-killed LpK71 (50mg dry powder) significantly reduced the number of nose blows and the score of nasal congestion within 3 h following exposure to JC pollen. After a few days following exposure to JC pollen, the number of sneezes and the score of throat scratchy symptom severity were significantly suppressed by heat-killed LpK71 ingestion. Meanwhile, in BALB/c mice immunized with Cry j1 and $Al(OH)_3$ gel intraperitoneally, heat-killed LpK71 feeding attenuated the increase in serum IgE level while simultaneously reducing the nasal scratching score upon challenge with Cry j1.

1）Food Sci. Technol. Res., 19 (1), 127-132, 2013.

Lactobacillus paracasei K71, Japanese cedar pollen, allergy

講演番号：2D02-07
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 09:30～ ミーティングルーム D

ウーロン茶ポリフェノールの腸管上皮細胞における miRNA 発現調節作用とその機能

The effect of oolong　tea polyphenol on miRNA expression in intestinal cells

○楊 琳云、林 庭安、丸亀 裕貴、藤村 由紀、立花 宏文（九大院農院・生機科）
○Linyun YANG, Tingan LIN, Yuki MARUGAME, Yoshinori FUJIMURA, Hirofumi TACHIBANA (Kyushu Univ.)

Oolonghomobisflavan B (OHBFB) はウーロン茶に含まれるポリフェノールであり、膵リパーゼ阻害作用をはじめとした多彩な生体調節作用を有することが知られている。しかしながら、OHBFB は体内への吸収率が非常に低く、その作用メカニズムは未だに不明な点が多い。一方、MicroRNA (miRNA) は mRNA の発現を負に制御することから、様々な生命現象に関与する生体調節因子として注目されている。そこで本研究では、OHBFB の作用メカニズムに腸管から分泌される miRNA が関与すると仮定し、腸管上皮細胞を用いて miRNA 発現調節作用ならびにその機能を明らかにすることを目的とした。

ヒト結腸がん細胞株 Caco2 を cell culture insert で培養し、極性をもった単層膜に分化させることで、腸管上皮細胞モデルを構築した。この腸管上皮細胞培養系に OHBFB(5 μM)を管腔側から添加し、細胞内および培養上清中の存在する miRNA を次世代シーケンサーにて解析した。その結果、Caco2 細胞内の miRNA 発現量は変動しなかったものの、管腔側において 4 種類の miRNA、基底膜側では 1 種類の miRNA の発現量が変動した。そこで、基底膜側上清において発現が変動した miRNA をヒト肝がん細胞株 HepG2 に導入したところ、脂質代謝関連遺伝子である APOA1 および CPT1A の発現が上昇した。以上の結果より、OHBFB が腸管上皮細胞の miRNA の発現調節を介して肝細胞の脂質代謝関連遺伝子の発現に影響を与える可能性が示された。

Oolonghomobisflavan B (OHBFB), one of the polyphenols contained in oolong tea, is known to have various biological functions, including the inhibitory effect on pancreatic lipase. However, OHBFB has a very low absorption rate in the body and its mechanism of biological functions has been poorly understood. MicroRNA (miRNA) is reported to be involved in various biological processes through suppression of expression of mRNAs. In this study, we aimed to elucidate the regulatory effect of OHBFB on miRNAs secreted from the intestinal tract using an intestinal model.

Caco-2 cells were differentiated to polarized monolayers separating the apical and basolateral membranes. We analyzed the miRNA expression levels in both cells and cell culture supernatant by next generation sequence after the treatment with 5 mM OHBFB. It is clarified that OHBFB regulates the expression of miRNAs via the intestinal tract.

Oolonghomobisflavan B (OHBFB), microRNA, intestinal cell

講演番号：2D02-08
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 09:30～ ミーティングルーム D

25-hydroxycholesterol は肝細胞における飽和脂肪酸毒性を増強させる

25-hydroxycholesterol promotes SFA-induced lipotoxicity in hepatocytes

○有澤 琴子[1]、山田 安香音[2]、岸本 真弥[2]、藤原 葉子[3,4]、市 育代[3,4]([1]お茶大・食物、[2]お茶大院・ライフ、[3]お茶大・基幹研究院、[4]お茶大・HLI 研)
○Kotoko ARISAWA[1], Akane YAMADA[2], Maya KISHIMOTO[2], Yoko FUJIWARA[3,4], Ikuyo ICHI[3,4]([1]Dep. Nut. and Food Sci., Ochanomizu Univ., [2]Grad. Sch. Life Sci., Ochanomizu Univ, [3]Fac. Core Res., Ochanomizu Univ., [4]Inst. HLI, Ochanomizu Univ.)

近年、食事に由来する脂肪の質と非アルコール性脂肪肝炎（NASH）発症の関連性が示唆されている。NASH 患者は飽和脂肪酸やコレステロール の摂取が多いことが報告されており、NASH モデルマウスの肝臓では、単純性脂肪肝のマウスと比べて酸化コレステロールが多く蓄積するという報告もある。これらの脂質はそれぞれ単独で肝臓における炎症や酸化ストレス、細胞死などに寄与していることが報告されているが、同時に存在することの影響は明確ではない。本研究では、飽和脂肪酸と酸化コレステロールの蓄積が、相互作用的に肝障害を増悪している可能性を明らかにすることを目的とした。酸化ステロールは、食事性・内因性の違いや酸化部位の構造的な違いにより異なる機能性を持つことが知られている。本研究では、食事性かつ内因性の酸化コレステロールである 25-hydroxycholesterol (25-OH) を用いた。

培養肝細胞 HepG2 に、飽和脂肪酸であるパルミチン酸（C16:0）100 μM と、25-OH 10 μM を各々あるいは同時に添加し、添加後 24 時間の細胞生存率を調べたところ、パルミチン酸を単独で添加するとコントロールと比べて細胞生存率が 8 割程度まで低下し、25-OH との同時添加では 4 割程度とより低下することがわかった。アポトーシスマーカーである活性型 Caspase-3 のタンパク質発現量はパルミチン酸単独添加と比べて 25-OH との同時添加で増加し、小胞体ストレスマーカーである CHOP の遺伝子発現も同時添加により増加したことから、25-OH はパルミチン酸による脂肪毒性を増強することが示唆された。本演題では、これらのストレス増強による細胞死の経路について詳細な解析を示す。

Recently, an association between the quality of dietary fat and the development of NASH has been suggested. NASH patients report to have a high intake of saturated fatty acids (SFAs) and cholesterol, but the effects of the simultaneous presence of these lipids have not been clarified. We investigated the effect of oxysterol on SFA-induced lipotoxicity in hepatocytes.

The number of viable cells decreased with the addition of palmitic acid alone, but simultaneous addition of palmitic acid and 25-OH resulted in a further decrease of the number of viable cells. The protein expression of cleaved Caspase-3, which is in an apoptosis marker was increased by simultaneous addition of palmitic acid and 25-OH. The gene expression of CHOP, a marker of ER stress, was also increased by simultaneous treatment of these lipids. These results suggested that an oxysterol such as 25-OH enhanced the cytotoxicity of SFAs.

oxysterol, hepatocyte, apoptosis

発表責任者：有澤 琴子（arisawa.kotoko@ocha.ac.jp）

講演番号：2D02-09
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 09:30～ ミーティングルーム D

フコースがマウス脂肪細胞のトランスクリプトームに及ぼす影響

Transcriptomic changes induced by fucose in mouse adipocyte

○中尾 友彦[1]、小南 友里[1]、苑 暁[1]、潮 秀樹[1]、伊東 美保[2]、相澤 光輝[2]、久保村 大樹[2]、赤堀 雄介[2]（[1]東大院農、[2]焼津水産化学工業（株））
○Tomohiko NAKAO[1], Yuri KOMINAMI[1], Xiao YUAN[1], Hideki USHIO[1], Miho ITO[2], Teruki AIZAWA[2], Daiki KUBOMURA[2], Yusuke AKAHORI[2] ([1]The Univ. of Tokyo, [2]YSK)

【目的】フコース（6-デオキシ-ガラクトース）は，哺乳類において ABO 式血液型の糖鎖構成単糖であることや母乳に遊離状態で含まれるなど身近な糖であり，細胞の運命決定に重要な役割を持つ糖鎖修飾単糖の一つでもある．これまで演者らは，マウスにおいてフコースが脂質異化作用や内臓脂肪蓄積抑制作用を示すことを明らかにしてきた．マウスにおける抗肥満作用は確認されたものの，脂肪細胞における作用機序の詳細については未だ不明である．そこで本研究では，フコースの作用機序を明らかにすることを目的として，フコースが脂肪細胞の遺伝子発現に及ぼす影響について検討した．
【方法】マウス前駆脂肪細胞 3T3-L1 を常法によって脂肪細胞へ分化誘導後，0.1%グルコース存在下の元，5 mM フコース含有培地にて 24 時間培養した．全 RNA を抽出し，トランスクリプトーム解析を行った．フコース不含培地にて同様に処理したものを対照区とした．
【結果】フコース投与によって発現量が上昇した遺伝子について GO enrichment 解析を行った．その結果，Biological Process において regulation of lipoprotein lipid oxidation, positive regulation of fatty acid metabolic process, fatty acid catabolic process など脂質異化作用に関与する GO term が多数確認された．さらに，Cellular Component において mitochondria membrane part, mitochondrial part, mitochondrial matrix などミトコンドリアを構成する GO term が多数確認された．以上から，フコースは脂肪細胞においてミトコンドリア機能を亢進し，脂質異化を促進する可能性が示唆された．

Fucose (6-deoxy-galactose) is found in the free form in breast milk and it is one of monosaccharides composing N-linked glycans. Previously, we have shown that fucose has lipid catabolic effects and inhibits visceral fat accumulation in mice. Although the anti-obesity effect was confirmed in mice, the details of the mechanism in adipocyte are still unknown. In this study, we investigated the effects of fucose on transcriptome profile in adipocytes to elucidate the mechanism of action of fucose.

Mouse preadipocyte 3T3-L1 were differentiated into adipocytes and cultured in 5 mM fucose-containing medium for 24 hours in the presence of 0.1% glucose. Total RNA was extracted and transcriptome analysis was performed. As a result, it is identified that GO term involved in lipid oxidation such as regulation of lipoprotein lipid oxidation, positive regulation of fatty acid metabolic process, fatty acid catabolic. Furthermore, many GO terms such as mitochondria membrane part, mitochondrial part, and mitochondrial matrix were identified in the Cellular Component.

fucose, lipid metabolism, transcriptome

発表責任者：潮 秀樹（aushio@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2D02-10
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 09:30～ ミーティングルーム D

エゾウコギの骨格筋エネルギー代謝、脂肪細胞の脂質代謝および持久性運動能力への影響

Effect of *Eleutherococcus senticosus* on skeletal muscle energy metabolism, adipocyte lipid metabolism and endurance exercise capacity

○小野 夏彦[1]、瓜生 圭介[1]、丸 勇史[1]、吉川 万紀[2]、岡田 陽子[2]、橋本 健志[2]([1]備前化成、[2]立命館大)
○Natsuhiko ONO[1], Keisuke URYU[1], Isafumi MARU[1], Maki YOSHIKAWA[2], Yoko OKADA[2], Takeshi HASHIMOTO[2] ([1]Bizen Chemical Co., Ltd., [2]Ritsumeikan University)

エゾウコギ(*Eleutherococcus senticosus*)(ES)はウコギ科の植物で古くから薬用植物として食されてきた。ES の経口摂取により運動機能の向上や脂肪の低減が、ヒト試験で明らかにされている。これはエネルギー産生や脂質代謝に関与することを示唆しているが、メカニズムは明らかにされていない。そこで本研究では、マウス横紋筋細胞(C2C12 細胞)およびマウス前駆脂肪細胞(3T3-L1 細胞)を用いて、ES のエネルギー代謝および脂質代謝への影響を検討した。また ICR マウスを対象に ES 経口摂取による持久性運動能力への影響について検討した。その結果、ES 無添加に対して有意な C2C12 細胞での AMPK (AMP-activated protein kinase)のリン酸化の促進、3T3-L1 細胞での細胞内の脂肪蓄積の減少及び脂肪分解に関連する ATGL の発現増加を認めた。また ES エキス粉末を自由摂取した ICR マウスは、コントロール群と比較して走行距離が有意に増加した。以上のことから、運動機能の向上に関与し得る骨格筋におけるエネルギー代謝能を促進する可能性及び脂肪分解の亢進作用により、脂肪蓄積を抑制する可能性が示唆された。加えて ES 摂取による走行距離が増加したことから、ES が持久性運動能力を向上させる可能性も示唆された。

Siberian ginseng (*Eleutherococcus senticosus*) (ES) is a plant of the Araliaceae family and has been eaten as a medicinal plant for a long time. In addition, human studies have shown that oral intake of ES improves exercise capacity and reduces fat. This suggests that ES is involved in energy production and lipid metabolism, but the mechanisms remain unknown. In this study, we investigated the effects of ES on energy metabolism in mouse striated muscle cells (C2C12 cells), differentiation of mouse precursor adipocytes (3T3-L1 cells), and lipid metabolism. We also examined the effects of ES intake on endurance capacity in ICR mice.
As a result, phosphorylation of AMPK (AMP-activated protein kinase) was promoted. Intracellular triglycerol content was significantly reduced. The expression of lipolysis-associated lipase ATGL was significantly increased. In addition, ICR mice who freely ingested ES extract powder showed a significant increase in endurance exercise capacity compared with the control group. ES may improve energy metabolism in skeletal muscle, and suppress fat accumulation by enhancing lipolysis, which might associated with improved endurance capacity.

Siberian ginseng, AMPK, lipolysis

発表責任者：小野夏彦（natsuhiko-ono@bizen-c.co.jp）

講演番号：2D02-11
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 09:30～ ミーティングルーム D

香辛料 Grains of Paradise に含まれるバニロイド成分の抗肥満活性

Anti-obesity effect of the vanilloid constituents in Grains of Paradise

○服部 浩之[1,2]、森 崇[3]、柴田 貴広[2]、北 将樹[2]、光永 徹[3]([1]名大 ASCI、[2]名大院生命農、[3]岐大応生)
○ Hiroyuki HATTORI[1,2], Takashi MORI[3], Takahiro SHIBATA[2], Masaki KITA[2], Tohru MITSUNAGA[3] ([1]Nagoya Univ. ASCI, [2]Nagoya Univ., [3]Gifu Univ.)

これまでに我々は，西アフリカの香辛料 Grains of Paradise (GOP) の新規機能開拓を目指し，20 種のバニロイドおよびジアリルヘプタノイドなどを構造決定するとともに，肥満抑制効果を実証してきた。本研究では，合成した GOP バニロイドを用いた *in vivo* 実験より，肥満に関する遺伝子発現変化を調査することで GOP の肥満抑制機構を明らかにすることを目的とした。マウスを用いた飼育実験において，各組織重量や血清および肝臓総コレステロール (TC)，トリグリセリド (TG) 濃度を測定した。GOP 抽出物や 6-paradol は体重増加や脂肪組織量だけでなく，肝臓の TC および TG 濃度を有意に減少した。一方で，6-gingerol は体重増加には影響せず，肝臓の脂質代謝改善に大きく寄与した。また 6-shogaol の作用は低かった。これらの結果から，体重増加や脂肪蓄積，脂質代謝改善に効果的な GOP 成分はそれぞれ異なり，各成分が相加的に機能することで GOP の肥満抑制作用を発現したと考えられる。この肥満抑制作用が，トウガラシに含まれる capsaicin のように交感神経の活性化を介した熱産生に起因するものであると推測し，褐色脂肪組織支配交感神経活動 (BAT SNA) を測定したところ，予想に反し，GOP 抽出物や 6-gingerol の経口投与は BAT SNA を減少した。GOP には capsaicin と非常に類似した構造の化合物が多く含まれるものの，その肥満抑制作用は，効能という面においてのみ capsaicin と一致し，作用機構という面においては異なることが明らかとなった。そこで各組織における肥満関連遺伝子発現を分析したところ，肝臓および脂肪組織における脂肪酸合成遺伝子 Fatty Acid Synthase (FAS) の発現量は，GOP 抽出物や 6-gingerol の経口投与により顕著に減少した。

Grains of Paradise (GOP) is one of the names given to the dried seeds of the tropical plant *Aframomum melegueta*. To develop GOP as a conducive material for obesity prevention, we currently found 20 vanilloids and diarylheptanoids and its anti-obesity effect of the seed. Here, we synthesized three GOP vanilloids to elucidate its anti-obesity effect. In the *in vivo* assay, GOP extract and 6-paradol significantly reduced their body weight gain and TC and TG concentrations in liver. On the other hand, 6-gingerol only affected the amelioration of lipid metabolism without any effect on body weight gain and adipose tissue weight. These results suggested that each GOP component has strong effect on the prevention of body weight gain, lipid accumulation, and lipid metabolism and expressed the overall anti-obesity effect of GOP by each component additively functions.

Grains of Paradise, anti-obesity, vanilloid

発表責任者：服部　浩之（hattorih@agr.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：2D02-12
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 09:30～ ミーティングルーム D

8-プレニルナリンゲニンの肥満抑制効果

8-prenylnaringenin suppresses diet-induced obesity

○山田 詩奈[1]、中島 賢則[2]、卯川 裕一[2]、大江 健一[2]、向井 理恵[3]、芦田 均[1]、山下 陽子[1]([1]神戸大院・農、[2]ダイセル（株）、[3]徳島大院・社会産業理工)
○Shina Yamada[1], Takanori Nakashima[2], Yuichi Ukawa[2], Kenichi Ooe[2], Rie Mukai[3], Hitoshi Ashida[1], Yoko Yamashita[1] ([1]Kobe Univ., [2]Daicel Co., Ltd, [3]Tokushima Univ.)

8-プレニルナリンゲニン(8-PN)は、ホップ(*Humulus lupulus* L)に含まれるキサントフモールからビールの製造過程や腸内細菌などのプレニルトランスフェラーゼの触媒作用により生成される。先行研究において、8-PN は廃用性筋萎縮を抑制するなど、さまざまな生体機能性が知られているが、肥満予防に及ぼす影響とその作用機構については明らかではない。そこで、本研究では 8-PN の肥満抑制効果およびその作用機構解明を目的とした。8-PN の肥満抑制効果は①食事誘導性肥満モデルマウスでの長期摂取試験と②単回脂質負荷試験の二つの実験にて評価した。①AIN-93M 普通食および 30%ラード添加高脂肪食に 8-PN を 0.0005%あるいは 0.005%の濃度で混餌した飼料を作成し、C57BL/6 マウスに 8 週間自由摂取させた。実験終了時に体重および各組織重量を測定した。心採血にて採取した血漿は、各種血液マーカーの測定に供した。その結果、高脂肪食に 8-PN を添加した群では、高脂肪食による体重および腸間膜脂肪組織、腎周囲脂肪組織、精巣上体脂肪組織、ならびに皮下脂肪組織重量の増加が有意に抑制された。血中コレステロール値および血中グルコース濃度の上昇も 8-PN で有意な抑制が認められた。②C57BL/6 マウスに 5 mg/kgBW の 8-PN を単回経口投与し、同時にオリーブオイル 5 ml/kgBW を負荷した 0 から 6 時間後までの尾静脈血を採取して、血中トリグリセリド濃度を測定した。その結果、オリーブオイル投与による血中トリグリセリド濃度の上昇が、8-PN 群では投与 4 時間後には有意な低値を示した。以上の結果から、8-PN は低濃度の摂取で高い肥満抑制効果を有し、その作用機構の一端には脂質の吸収抑制が関与することが示唆された。

8-prenylnaringenin (8-PN) is a prenylflavonoid from Hop (*Humulus lupulus* L), and has several health beneficial effects, such as anti-muscle atrophy. However, the effect of 8-PN on anti-obesity and its mechanism is still unclear. In this study, we investigated the preventive effect of 8-PN on adiposity and its mechanism in C57BL/6 mice. ① C57BL/6 mice were fed normal or high-fat diet supplemented with 8-PN (0.0005% and 0.005%) for 8 weeks. At the end of the experiment, the plasma lipids were measured. As a result, 8-PN suppressed the HF diet-induced body weight gain and fat deposition. In addition, the plasma cholesterol and glucose levels were decreased in the 8-PN groups. ②Next, we performed a single oral administration study. C57BL/6 mice were orally administrated 8-PN at 5mg/kg BW. Oral fat tolerance test (OFTT) were performed. As a result, plasma triglyceride level was lower in the 8-PN group compared with the control group. These results indicated that 8-PN prevented diet-induced obesity and fat absorption. Thus, 8-PN could be a valuable food factor for preventing obesity.

8-prenylnaringenin, obesity, high-fat diet

講演番号：2D02-13
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 09:30～ ミーティングルーム D

Chemical, microbial and functional properties of amazake fermented with different kefir grains

○Raul Ricardo GAMBA, Rina OYA, Memi UMEDA, Takashi KOYANAGI, Toshiki ENOMOTO
(Department of Food Science (Ishikawa Prefectural University))

Amazake is a japanese traditional sweet drink. This beverage is made from rice koji, which is produced by *Aspergillus oryzae* growing on steamed rice and water. Kefir is fermented beverage produced from mammals' milks or sugar solutions by metabolic activity of kefir grains, which are constituted of lactic acid and acetic acid bacteria and yeasts. The aim of this work was to study the capability of sugary and milk kefir grains to ferment amazake. Chemical, microbial and functional analyses were performed.

Kefir grains were cultivated in amazake at 25°C for 24 h. Seven consecutive fermentations were performed with each grain. Samples were obtained and dilutions were performed in peptone water (0.1% w/v). Diluted samples were inoculated in MRS agar, GYC agar and PDA for lactic and acetic acid bacteria and yeasts, respectively. Isolated microorganisms were identified by 16/28S sequencing method. Fermented beverages were centrifuged and filtrated by 0.22 μ membranes, which were used for amino acids, organic acids, glucose and ethanol determinations. Additionally, antibacterial (against *E. coli*, *S. aureus* and *S.* Typhimurium), antioxidant, angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitory and α-glucosidase inhibition activities were measured. Sugary (SG) and milk kefir grains (MG) fermented amazake, but their biomass decreased after successive fermentations. Two amazake kefirs showed different fat and carbohydrates contents between each other and to non-kefir amazake. SG amazake presented lower °Brix and carbohydrate content and consumed more glucose and produced more ethanol than MG amazake. MG amazake showed more stable microbial groups than SG amazake. *Lactobacillus kefiranofaciens* and *Kazachstania unispora* were presented in both kefirs. Other species were differentially in each kefir. Both amazake kefirs showed substantial lower microbial diversity than those observed in original substrates (brown sugar kefir and cow's milk kefir), suggesting that amazake exerts strong selection on microbial populations. ACE-inhibitory activity improved in amazake after successive fermentations with both grains, but MG amazake showed variable results in each fermentation. Antibacterial and antioxidant activities also improved after fermentations, in both kefirs. α-glucosidase inhibition showed ambitious results.

kefir, amazake, microbial and function

講演番号：2D02-14
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 09:30～ ミーティングルーム D

5-ヒドロキシ-7-メトキシフラボンによる GPR97 活性化機構の解明

Elucidation of GPR97 activation mechanism by 5-hydroxy-7-methoxyflavone

〇前川 大輔、原田 直樹、山地 亮一（大阪府大院・生命環境）
〇Daisuke MAEKAWA, Naoki HARADA, Ryoichi YAMAJI (Osaka Prefecture Univ.)

【目的】黒ショウガに含まれる 5-hydroxy-7-methoxyflavone (HMF) 類縁体が，マウス由来 C2C12 筋管細胞を肥大させ，老化促進モデルマウス SAMP1 のヒラメ筋の重量を増加させることを見出した[1)]。接着型 G タンパク質共役型受容体のクラス VIII に属する GPR97 は骨格筋で発現しているが，その機能は不明である。本研究では HMF による筋肥大における GPR97 の関与を検討した。

【方法・結果】C2C12 筋芽細胞において GPR97 を高発現させ，HMF 存在下で筋管細胞に分化させたところ，HMF による筋管細胞の肥大は GPR97 の高発現によってさらに増大した。HMF が GPR97 を活性化するシグナル経路を評価するため，C2C12 筋芽細胞に SRF 応答ルシフェラーゼレポーターベクターと GPR97 発現ベクターを形質導入し，HFM 存在下で培養した。HMF は SRF 活性を増加し，GPR97 の高発現は HMF による SRF 活性をさらに活性化した。GPR97 を介した SRF 活性における HMF の構造-活性相関を評価したところ，HMF の A 環の 5 位のヒドロキシ基と 7 位のメトキシ基の両方が GPR97 を介した SRF の活性化に必要であることが判明した。これらの結果から，HMF は GPR97-SRF シグナル経路を活性化し，筋肥大を促進することが示唆された。

【Purpose】We have reported that Kaempferia parviflora-derived 5-hydroxy-7-methoxyflavone (HMF) derivatives promote hypertrophy in C2C12 myotubes and increase soleus muscle mass in senescence-accelerated mouse-prone 1 mice[1)]. GPR97, a member of class VIII of the adhesion G protein-coupled receptors, is expressed in skeletal muscle, but its function remains unknown. In this study, we investigated the involvement of GPR97 in HMF-induced muscle hypertrophy.

【Methods・Results】When C2C12 myoblasts were transfected with GPR97 and were differentiated into myotubes in the presence of HMF, the HMF-induced hypertrophy of myotubes was further increased by overexpression of GPR97. To evaluate the signaling pathway by which HMF activates GPR97, C2C12 myoblasts were transfected with SRF-responsive luciferase reporter vector and GPR97 expression vector and were cultured in the presence of HFM. HMF increased SRF activity, and overexpression of GPR97 further increased HMF-activated SRF activity. The structure-activity relationship of HMF in GPR97-meidated SRF activity showed that both the 5-hydroxy and 7-methoxy groups of HMF were required for HMF-induced SRF activation via GPR97. These results suggest that HMF promotes muscle hypertrophy by activating the GPR97-SRF signaling pathway.

1) Ono S, Yoshida N, Maekawa D, *et al.*, *Food Sci. Nutr*, 7:312-321, 2019

5-hydroxy-7-methoxyflavone, GPR97, skeletal muscle

講演番号：2D02-15
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 09:30～ ミーティングルーム D

ヒト表皮角化細胞において *Lactobacillus crispatus* KT-11 が皮膚バリア機能に及ぼす影響

Effect of *Lactobacillus crispatus* KT-11 on skin barrier function in human epidermal keratinocytes.

○星 芙美香、渡邉 樹（株式会社キティー）
○Fumika HOSHI, Itsuki WATANABE (KITII Corporation)

【背景・目的】*Lactobacillus crispatus* KT-11（KT-11 株）は、マウス細胞培養系において Th1 を強く誘導する乳酸菌株としてスクリーニングされ、これまでに食品原料としてアレルギーの改善作用や感染症に対する予防的作用を持つことや、化粧料としてヒアルロン酸産生促進作用や *SOD 2* 発現促進作用、*MMP-3* 発現抑制作用などの皮膚機能改善作用を持つことが示されている。しかしながら、皮膚において異物侵入や感染防止などの保護的な作用に関連する皮膚のバリア機能に及ぼす影響は明らかになっていない。そこで本研究では、KT-11 株が皮膚のバリア機能に及ぼす影響についてヒト表皮角化細胞を用いて評価した。
【方法】ヒト表皮角化細胞を 1×10^5cells/ml/well に調製し培養した。培養後、KT-11 株を添加して 24 時間培養した。24 時間培養後の細胞から total RNA を回収し、皮膚のバリア機能に関与する遺伝子の発現を定量 RT-PCR 法により評価した。また、正常ヒト表皮角化細胞を Transwell プレートのインサート側に播種した後、KT-11 株を添加し経上皮電気抵抗値（TER）の変化を経時的に測定した。
【結果・考察】定量 RT-PCR による解析の結果、KT-11 株はタイトジャンクション構成タンパクである occludin(*OCLN*)、claudin4(*CLDN4*)の発現量を濃度依存的に増加させた。Transwell を用いた試験では、KT-11 株の添加により、濃度依存的な TER の増加も認められた。以上の結果より、KT-11 株は、タイトジャンクション形成を促進し皮膚バリア機能向上作用を有することが示唆された。

Background: *Lactobacillus crispatus* KT-11 (KT-11 strain) has been shown to prevent infection and to improve skin functions. In this study, we evaluated the effect of KT-11 strain on skin barrier function using human epidermal keratinocytes.
Methods: Human epidermal keratinocytes cultured for 24 hours with KT-11 strain were used to evaluate the expression of genes related to skin barrier function by quantitative RT-PCR. Normal human epidermal keratinocytes were seeded into Transwell insert, and changes in transepithelial electrical resistance (TER) were measured over time after the addition of KT-11 strain.
Results and Discussion: KT-11 strain increased the expression of occludin (*OCLN*) and claudin 4 (*CLDN4*), which are tight junction components, and TER in a concentration-dependent manner. These results suggest that KT-11 strain have the ability to promote tight junction formation and improve skin barrier function.

Lactobacillus crispatus KT-11, keratinocytes, skin barrier

講演番号：2D02-16
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 09:30～ ミーティングルーム D

ウコン属植物ガジュツ(*Curcuma zedoaria*)の糖質分解酵素阻害活性

The inhibitory activity of *Curcuma zedoaria* against carbohydrate hydrolyzing enzymes

○山崎 一諒、細川 敬三（兵庫大学健康科学）
○kazuaki yamasaki, Keizo Hosokawa (Hyogo Univ.)

【背景・目的】糖質の過剰摂取は血糖値の乱高下を引き起こし、肥満や炎症等の 2 型糖尿病発症のリスク要因へつながる。近年では食品が持つ多様な生体調節機能を用いた日々の食生活による血糖値の管理が注目されている。ガジュツ（*Curcuma zedoaria*）は紫ウコンとも呼ばれ、クルクミン類を含まない特徴的なウコン属植物である。伝統医学として炎症や糖尿病に利用された歴史があるが、糖質分解酵素に対する影響はほとんど調べられていない。そこで本研究では、日々の食生活による効果的な血糖値管理を達成するための新たな素材としてウコン属植物、特にガジュツに着目し、糖質の消化に関わるα-アミラーゼ、マルターゼ、スクラーゼに対する影響を評価した。
【方法】ガジュツ、ハルウコン、アキウコン、クスリウコンの乾燥粉末を購入した。各乾燥粉末は 50%または 100%メタノールで抽出を行い、乾固後 50%ジメチルスルホキシドに溶解して各種酵素阻害活性試験に供した。α-アミラーゼ阻害活性は、ブタ膵臓由来α-アミラーゼおよび可溶性デンプンを用い、酵素反応により生成した還元糖量をジニトロサリチル酸法により検出して阻害活性を算出した。スクラーゼおよびマルターゼ阻害活性は、ラット小腸アセトン粉末から粗酵素液を調製し、基質としてスクロースを用いた場合をスクラーゼ活性、マルトースを用いた場合をマルターゼ活性とした。反応液は Cosmosil 75C18-OPN に通した後、酵素反応により生成したグルコースを定量して阻害活性を算出した。活性の認められた試料は Diaion HP-20 を用いて分画し、適宜阻害活性試験に供した。
【結果・考察】マルターゼ阻害活性は、ガジュツの 50%メタノール抽出物（49.0%）、クスリウコンのメタノール抽出物（24.3%）、アキウコンの 50%メタノール抽出物（18.7%）の順で高かった。α-アミラーゼ阻害活性は、アキウコンのメタノール抽出（34.6%）、ハルウコンのメタノール抽出（10.0%）、アキウコンの 50%メタノール抽出（8.9%）の順で高かった。スクラーゼ阻害活性は、いずれのサンプルからも認められなかった。ガジュツ 50%メタノール抽出物を Diaion HP-20 を用いて分画した結果、特に 20-40%メタノール溶出画分に強いマルターゼ阻害活性が認められた。以上、ウコン属植物の中でも、特にガジュツに高いマルターゼ阻害活性を見出し、ガジュツによる効果的な血糖値管理の有用性が示唆された。Diaion HP-20 による分画の結果、比較的高極性化合物の寄与が考えられた。

Curcuma zedoaria has traditionally been used as a folk medicine. However, the inhibitory activity against carbohydrate hydrolyzing enzymes have not been investigated in detail. Therefore, we determined the inhibitory activity of four kinds of *Curcuma* plants containing *C. zedoaria* against α-amylase, sucrase and maltase. As the results, 50% MeOH extracts of *C. zedoaria* showed the highest inhibitory activity against maltase (49.0%). The present results indicate that the *C. zedoaria* may useful for decreasing postprandial hyperglycemia.

α-glucosidase inhibitor, *Curcuma zedoaria*, type 2 diabetes

発表責任者：山崎一諒（ykazuaki@hyogo-dai.ac.jp）

講演番号：2D04-01
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 10:30～ ミーティングルーム D

T 細胞依存性の異なる腸管粘膜 IgA に食品が及ぼす影響の解析

The effects of diet on the intestinal secretary IgA with different T cell dependency

○後藤 真生、若木 学、石川（高野） 祐子 (農研機構食品研究部門)
○Masao GOTO, Manabu Wakagi, Yuko Ishikawa-Takano (Food Research Institute, NARO)

腸管粘膜の恒常性維持に働く分泌型イムノグロブリン A には T 細胞依存的な TD-SIgA と非依存的な TI-SIgA が存在する。腸管粘膜の SIgA は管腔中に存在する食品などの影響を受けると想定されるが、TI-SIgA と TD-SIgA それぞれを区別して解析した知見はほとんど存在しない。そこで我々は卵白アルブミン（OVA）特異的 T 細胞レセプター遺伝子導入マウスを用いて同一個体内で食品が TI-SIgA と TD-SIgA に及ぼす影響を個別に評価した。その結果、１）粗飼料投与マウス（非感作）では TI-SIgA の高値を示す個体と低値個体の 2 群が存在し、精製飼料投与に代えると、高値個体では SIgA 量が有意に低減したが、低値個体では変化がなかった。２）OVA の経口感作により TD-SIgA を誘導すると、低値個体の抗体価は高値個体よりも有意に高くなったが、感作前に精製飼料投与を行った場合には、高値、低値群ともに粗飼料投与群よりも抗体価は下がった。

以上の結果から、粗飼料は SIgA 分泌を促進する成分を含む事、TD-IgA の産生は TI-IgA に影響を受ける事が示唆された。

Intestinal secretory immunoglobulin A, in the retention of intestinal homeostasis, responses to diet and bacterial flora. SIgA (evaluated by fecal IgA) consists of T-dependent (TD) and T-independent (TI). We leveraged mice with ovalbumin (OVA)-specific T cell receptor to estimate the effects of diet on the TD- and TI-SIgA. The quantity of SIgA and the titer of TD-SIgA induced with orally administered OVA were compared between non-purified diet (NPD) and purified diet (PD) feeding groups. Mice were divided into two group by TI-SIgA value. The quantity of SIgA of High TI-SIgA group drastically decreased by PD intake though that of low group was not changed. And titer of TD-SIgA of low group was higher than that of high group and the titer decreased by PD intake on both groups. These findings suggested that NPD helps the secretion of SIgA and TD-SIgA was affected by TI-IgA.

SIgA, T cell dependency, diet

発表責任者：後藤　真生（masaogot@affrc.go.jp）

講演番号：2D04-02
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 10:30～ ミーティングルーム D

マウス RAW264.7 細胞において発現している苦味受容体の機能解析

The analysis of the function of bitter taste receptor in mouse macrophagic RAW264.7 cells

○平原 結奈、大泉 由佳、大崎 雄介、駒井 三千夫、白川 仁（東北大・院農・栄養学）
○ YUNA HIRAHARA, YUKA OIZUMI, YUSUKE OHSAKI, MICHIO KOMAI, HITOSHI SHIRAKAWA (Lab. Nutr., Grad. Sch. Agri. Sci., Tohoku Univ.)

［目的］苦味受容体である Taste receptor type 2（TAS2R）はヒトでは 25 種、マウスで 35 種存在し、口腔、消化器、呼吸器において発現して、苦味物質を含む異物の受容とそのシグナル伝達に関与している。一方、TAS2R は脳、精巣などの組織においても発現しているが、それらの組織のおける機能は十分に明らかとなっていない。本研究では、マウス由来マクロファージ様細胞である RAW264.7 細胞において発現が見られる mTas2r の機能の解明を目的として、苦味物質刺激後の遺伝子発現変化を指標として解析した。
［方法］RAW264.7 細胞を典型的な苦味物質である塩酸キニーネで刺激して、一定時間後の RNA を回収し、RNAseq 法によりトランスクリプトーム解析を行った。また、定量 RT-PCR 法により炎症性サイトカインの mRNA 量を測定した。
［結果］塩酸キニーネ刺激前と比較して 2 倍以上の変化が見られた遺伝子数は、刺激 1 時間後で 484 種（上昇 337、低下 147）、3 時間後では 508 種（上昇 303、低下 205）であった。GO 解析およびパスウェイ解析を行ったところ、生体防御や細胞増殖に関連する遺伝子の発現に変化が見られ、特に PLCβ-PKCα経路とその下流の c-Src-IKKα/β-NF-κB 経路の活性化が示唆された。一方、定量 RT-PCR 法により測定した *Il-1β*、*Il-6*、*Tnfα* mRNA 量は、塩酸キニーネ刺激により有意に上昇していた。以上のことから、mTas2r はマクロファージ様細胞において NF-κB を介して炎症応答に関与する可能性が示唆された。

Taste receptor type 2 (TAS2R) is a member of G coupled receptor that senses bitter taste. The expression of TAS2R is observed not only in oral, intestinal, and respiratory organs, but also brain and testis. However, its role in extra-oral tissues has not been fully elucidated. In this research, we aimed to clarify the function of mTas2r in mouse macrophagic RAW264.7 cells. We isolated total RNA from the cells that were treated with quinine hydrochloride (QH), a typical ligand of mTas2r, and obtained mRNA profile by RNAseq. In GO and pathway analyses, the expression of genes involved in host defense and cell proliferation were significantly modulated by QH treatment. These data suggested that QH treatment can stimulate PLCβ-PKCα pathway and its downstream c-Src-IKKα / NF-κB pathway. Quantitative RT-PCR analyses revealed that inflammatory cytokines mRNA were elevated by QH treatment. Therefore, mTas2r could modulate inflammatory response via NF-κB activation in macrophage-like cells..

Bitter taste receptor, RNAseq, Macrophage

講演番号：2D04-03
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 10:30～ ミーティングルーム D

ビオチンが腸管免疫系の細胞応答に与える影響

Immunomodulatory effect of biotin on the intestinal immune system

○池田 大貴、岡田 開、古川 凱斗、増山 大雅、竹ノ内 優介、川上 里奈、加藤 仁美、津田 真人、細野 朗（日大生資科）
○Taiki Ikeda, Hiraku Okada, Kaito Furukawa, Taiga Masuyama, Yusuke Takenouchi, Rina Kawakami, Hitomi Kato, Masato Tsuda, Akira Hosono (Nihon Univ.)

ビオチンは、水溶性ビタミンとして生体の生理機能を営むために食品から摂取する必要がある一方で、宿主の腸内細菌が生合成するビタミンでもある。これまでにビオチン欠乏が生体の炎症反応に関与していることが報告されているが、宿主の腸管免疫系や抗体産生に与える影響はほとんど分かっていない。本研究は生体内でビオチンが欠乏することにより生じる腸管免疫系に関与する B 細胞、T 細胞応答に与える影響について解析することをめざした。

BALB/c マウスを通常（CV）または無菌（GF）環境下で、標準食もしくはビオチン欠乏食を 8-12 週間自由摂取させた。そして、脾臓（SPL）、パイエル板（PP）、盲腸リンパ節（CeP）、結腸リンパ節（CoP）細胞中の B 細胞および T 細胞のフェノタイプをフローサイトメトリーにより解析した。さらに、腸管粘膜組織中の抗体量および血清中の抗体量を ELISA 法で測定した。

その結果、ビオチン欠乏食は CV、GF マウス共に胚中心 B 細胞の割合を減少させる可能性が考えられた。しかし血清中、腸管粘膜組織中の抗体産生量にビオチン欠乏食による顕著な影響は見られなかった。ビオチンは腸管免疫系細胞の分化誘導にも影響を与えている可能性がある。

Biotin, a water-soluble vitamin, is an essential nutrient for body as well as one of the metabolites by intestinal commensal bacteria. It is known that the biotin deficiency induces the inflammatory responses in the body, but the immunomodulatory effects of biotin on the intestinal immune system have not been fully elucidated.

we utilized BALB/c mice bred on a biotin-containing (control) or a biotin-deficient diet under conventional (CV) or germ-free (GF) condition. The phenotype of B or T cells in spleen (SPL), Payer’s patches (PP), cecal patches (CeP), colonic patches (CoP) were analyzed. The levels of antibodies in serum and the intestinal homogenates from cecum, colon were assayed by ELISA.

The frequency of germinal center B (GCB) cells of PP, CeP, and CoP cells from control diet GF mice was higher than those from biotin-free GF mice. Biotin in the intestinal tract may modify the cellular responses of the intestinal immune system.

biotin, commensal bacteria, immune response

発表責任者：細野　朗（hosono.akira@nihon-u.ac.jp）

講演番号：2D04-04
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 10:30～ ミーティングルーム D

プロピオン酸は腸管上皮 Caco-2 細胞の内皮細胞選択的接着分子の発現を高める

Propionate increases the endothelial cell-selective adhesion molecule in intestinal Caco-2 cells.

○諫山 佳奈、山本 祥也、鈴木 卓弥（広島大院　統合生命）
○KANA ISAYAMA, YOSHINARI YAMAMOTO, TAKUYA SUZUKI (Hiroshima Univ.)

【背景・目的】私たちは、腸内細菌の主要な代謝物である短鎖脂肪酸（酢酸、プロピオン酸、酪酸など）が、腸管上皮バリアの維持に重要な役割をもつことを提案している。しかしながら、酪酸に比べてプロピオン酸の作用機序はほとんど明らかにされていない。そこで本研究は、プロピオン酸による腸管上皮バリアの増強作用のメカニズムを明らかにすることを目的とした。
【方法・結果】ヒト腸管上皮 Caco-2 細胞にプロピオン酸（30 mM）を 24 時間作用させたところ、経上皮電気抵抗値が上昇し、タイトジャンクション（TJ）バリア機能の増強が確認された。DNA マイクロアレイ法により遺伝子発現を網羅的に解析した結果、プロピオン酸により内皮細胞選択的接着分子（ESAM）の発現が約 2.3 倍上昇しており、TJ バリア増強作用との関連が提案された。プロピオン酸による ESAM 発現の上昇は、定量 RT-PCR 法においても確認された。また、蛍光免疫染色により ESAM の細胞内局在を調べたところ、TJ タンパク質である Occludin と共局在することが示され、ESAM が腸管上皮においても TJ バリア機能に寄与することが提案された。プロモーターアッセイによって ESAM の転写制御への影響を調べた結果、プロピオン酸により ESAM 転写活性を示すルシフェラーゼ発現の増加が確認された。
【考察】これまでに腸管上皮の TJ バリアにおける ESAM の役割は知られていないが、以上の結果より、プロピオン酸による腸管 TJ バリア増強作用の一端を担っている可能性が考えられた。
[Background/Objective] Short-chain fatty acids play an important role in the maintenance of intestinal epithelial barrier. The aim of this study was to clarify the mechanism of the promotive effect on the intestinal epithelial barrier by propionate.
[Methods/results] Caco-2 cells were incubated with propionate (30 mM) for 24 h. Propionate increased the transepithelial electrical resistance, indicating the enhancement of the tight junction (TJ) barrier integrity. The DNA microarray analysis revealed that the gene expression of endothelial cell-selective adhesion molecule (ESAM) was increased by propionate. Immunofluorescence showed that ESAM co-localized with occludin, suggesting that ESAM possibly contribute to the TJ barrier of the intestinal epithelium.
[Conclusion] Our results suggest that ESAM may be related to promotive effect of propionate on the intestinal epithelial barrier.

short-chain fatty acids, intestinal epithelial cells, tight junction

講演番号：2D04-05
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 10:30～ ミーティングルーム D

γ-リノレン酸の乳酸菌代謝物であるγKetoC は NRF2 活性化を介して免疫抑制作用を発揮する

γKetoC, a metabolite of γ-linolenic acid by gut lactic acid bacteria, exerts immunosuppressive property by activating NRF2

○八代 拓也[1]、山本 愛日[1]、飯田 真由[1]、大村 さくら[1]、市原 学[2]、岸野 重信[3]、小川 順[3]、西山 千春[1] ([1]東理大基礎工、[2]東理大薬、[3]京大院農)
○Takuya YASHIRO[1], Asuka YAMAMOTO[1], Mayu IIDA[1], Sakura OHMURA[1], Gaku ICHIHARA[2], Shigenobu KISHINO[3], Jun OGAWA[3], Chiharu NISHIYAMA[1] ([1]Tokyo Univ. Sci. Bio., [2]Tokyo Univ. Sci. Pharm., [3]Kyoto Univ.)

腸内に生息する乳酸菌は、独自の経路を介して食餌由来の多価不飽和脂肪酸を飽和化し、その過程において宿主の代謝とは異なる中間体を生成する。過去の年会において我々は、γ-リノレン酸の乳酸菌代謝物であるγKetoC が、*in vitro* において CD4T 細胞と樹状細胞 (DC)の活性化を抑制し、マウス乾癬モデルにおいて病態を改善することを報告しており、γKetoC が免疫抑制作用を有することを明らかにしている。本研究では、腸内においてγKetoC が生成されることが宿主の免疫恒常性維持に如何にして貢献するのかを理解するために、γKetoC の免疫抑制作用の分子メカニズム解析を行った。

γKetoC の免疫抑制作用を仲介する分子として、炎症性サイトカインの遺伝子発現を負に調節することが最近報告された転写因子 NRF2 に着目した。γKetoC 処理した DC を解析したところ、 NRF2 タンパク質レベルと NRF2 標的遺伝子発現が有意に増加していることが明らかとなり、γKetoC が NRF2 を活性化することが示された。 *Nrf2* KO マウス由来の DC を用いて解析した結果、γKetoC による炎症性サイトカインの発現低下は、NRF2 の欠損により消失することが明らかとなった。以上より、γKetoC は NRF2 の活性化を介して炎症性サイトカインの遺伝子発現を負に制御することで、免疫抑制作用を発揮することを示された。

Polyunsaturated fatty acids are saturated by gut lactic acid bacteria (LAB) through a unique pathway, in which different types of intermediates from the host are produced. In the past JSBBA meetings, we have demonstrated that γKetoC, which is a metabolite of γ-linolenic acid by LAB, possesses immunosuppressive properties. γKetoC inhibits activation both of CD4 T cells and of dendritic cells (DC) *in vitro* and alleviates skin inflammation in the mouse psoriasis model. To understand how the production of γKetoC in the gut contributes to the homeostasis of the host immune system, we investigated the molecular mechanism underlying the immunosuppressive function of γKetoC.

We focused on a transcription factor NRF2, which is recently reported to work as a negative regulator of proinflammatory gene expression. NRF2 protein level and NRF2-target gene expression were significantly increased in γKetoC-treated DCs, suggesting that γKetoC activates NRF2. γKetoC-induced down-regulation of the expression of proinflammatory cytokines was diminished in DCs derived from *Nrf2* KO mice. Our results indicate that γKetoC exerts immunosuppressive properties through the down-regulation of proinflammatory cytokines by NRF2.

γ-linolenic acid, lactic acid bacteria, NRF2

講演番号：2D04-06
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 10:30～ ミーティングルーム D

漬物由来乳酸菌による IL-12 発現制御の解析

Analysis of regulation of IL-12 expression by lactic acid bacteria derived from Japanese pickles

○柴田 奈那[1]、日浦 月穂[1]、村田 美樹[2]、浅見 進也[2]、薩 秀夫[3] ([1]前橋工大院工、[2](株)新進・総合研究所、[3]前橋工大工)
○Nana SHIBATA[1], Tsukiho HIURA[1], Miki MURATA[2], Shinya ASAMI[2], Hideo SATSU[3] ([1]Grad. Sch. of Eng. Maebashi Inst. Technol., [2]Shin-Shin Foods Co.,Ltd., [3]Maebashi Inst. Technol.)

【目的】サイトカインの一種であるインターロイキン 12（IL-12）は、生体防御において主要な免疫細胞であるナチュラルキラー（NK）細胞を活性化することが報告されている。IL-12 はある種の乳酸菌などを認識したマクロファージや樹状細胞から分泌されることから、本研究では IL-12 産生を亢進する乳酸菌を、特に漬物より単離された乳酸菌を用いて探索・解析することとした。
【方法・結果】漬物由来乳酸菌をオートクレーブ処理して死菌体とし、マクロファージモデル J774.1 細胞に添加した。一定時間インキュベート後、細胞より RNA を抽出し real-time PCR 法を用いて IL-12 の mRNA 発現量を測定した。その結果、いくつかの乳酸菌株が IL-12 の mRNA 発現を顕著に亢進し、以降の実験では群馬県産漬物より単離された *Lactobacillus* 属の乳酸菌を用いることとした。本菌株を各種酵素で処理したところ、RNase 処理によって IL-12 の mRNA 発現亢進は有意に抑制された。そこで、Toll 様受容体（TLR）の中でも RNA をリガンドとすることが知られる TLR3、TLR7、TLR8 に注目し、RNA 干渉法を用いてこれらの TLR の関与を解析した。その結果、TLR8 をノックダウンすることによって IL-12 の発現亢進は有意に抑制され、本菌株による IL-12 産生亢進には TLR8 が一部関与することが示唆された。

【Objectives】Interleukin-12 (IL-12) is reported to activate natural killer cells that are initial immune cells in the biophylatic mechanism. As IL-12 is secreted from macrophages or dendritic cells exposed to some kinds of lactic acid bacteria (LAB), we searched for LAB that could induce IL-12 production among LAB isolated from Japanese pickles and analyzed in this study.
【Methods and Results】LAB derived from Japanese pickles were subjected to autoclave treatment, and then added to macrophage-like J774.1 cells. After incubation for 3 hours, RNA was isolated from J774.1 cells and IL-12 mRNA level was measured by real-time PCR. As a result, some kinds of LAB markedly increased mRNA expression of IL-12 and we focused on LAB isolated from Japanese pickles derived from Gunma. RNase treatment significantly suppressed LAB-induced IL-12 expression. Further knockdown of TLR8, one of TLRs which recognize RNA, significantly suppressed up-regulation of IL-12. These results suggest that RNA from LAB and TLR8 was involved in IL-12 induction by this strain.

IL-12, lactic acid bacteria, macrophage

発表責任者：薩　秀夫（satsu@maebashi-it.ac.jp）

講演番号：2D04-07
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 10:30～ ミーティングルーム D

*Lactobacillus plantarum*06CC2 摂取による高尿酸血症マウスにおける尿酸排泄系トランスポーターの発現増加効果

Increase of uric acid excretion transporter expression in hyperemic mice by *Lactobacillus plantarum*06CC2.

○川久保 響[1]、岩切 明日夏[1]、宮本 侑子[1]、後藤 聡太[1]、小川 健二郎[2]、西山 和夫[1]、Tsend-Ayush Chuluunbat[3]、Oyunsuren Tsendesuren[4]、李 怡然[5]、中野 智木[5]、竹下 正彦[5]、有馬 勇夫[5]、山﨑 正夫[1] ([1]宮崎大応生、[2]宮崎大 TT 推進機構、[3]蒙科技大、[4]蒙バイオ協会、[5]南日本酪農協同(株))
○Hibiki Kawakubo[1], Asuka Iwakiri[1], Yuuko Miyamoto[1], Souta Gotou[1], Kenjirou Ogawa[2], Kazuo Nishiyama[1], Chuluunbat Tsend-Ayush[3], Tsendesuren Oyunsuren[4], Yiran Ri[5], Tomoki Nakano[5], Masahiko Takeshita[5], Isao Arima[5], Masao Yamasaki[1] ([1]Univ. of Miyazaki, [2]Univ. of Miyazaki TT office, [3]Mongolian University of Science and Technology, [4]Mongolian Biotechnology Association, [5]Minami Nihon Rakuno Kyodo Co. Ltd.)

高尿酸血症患者数は年々増加しており、血中尿酸値を低下させる手段として乳酸菌摂取の有効性が示唆されている。本研究では *Lactobacillus plantarum* 06CC2 株（LP432）が尿酸代謝に与える影響を検討した。

5 週齢雄の Balb/c マウスを control 群、食餌中に 0.1 および 1%の LP432 を投与した Low LP432(LLB)群、High LP432(HLB)群に分けて 3 週間飼育した。control 群と比較して、LLB 群及び HLB 群で血漿中、尿中及び糞中尿酸値に有意な差はみられなかった。腎機能マーカーは LLB, HLB で改善する傾向が認められた。乳酸菌を投与した LLB 群及び HLB 群では、尿酸排泄トランスポーターである小腸の ATP-binding cassette transporter G2(ABCG2)とその発現安定に寄与する PDZK1 の発現の増加がみられた。ABCG2 を介して排泄される腎毒性物質 3-indoxylsulfuric acid(IS)の糞中量は、control 群と比較して LLB 群で有意に増加した。以上のことから、LP432 摂取による尿酸排泄トランスポーターの機能強化作用が示唆された。

Patients with hyperuricemia are increasing every year, and the intake of lactic acid bacteria is a putative routine way to normalize blood uric acid levels. *Lactobacillus plantarum* 06CC2 (LP432), which is derived from Mongolian dairy products, has been reported to have cholesterol-lowering effects. In the present study, the effect of LP432 on uric acid metabolism was examined.

Five-week-old male Balb/c mice were divided into three groups: control group, 0.1% LP432 (LLB), and 1.0% LP432 (HLB). Fecal uric acid levels did not differ significantly among dietary groups. Serum biomarkers for kidney injury were alleviated in the LLB and HLB. ABCG2, a excretion transporter of uric acid, and PDZK1 expressions in the small intestine was increased in the LLB and HLB groups. The kidney toxicant 3-indoxylsulfuric acid (IS) known to be excreted via ABCG2, and fecal IS was significantly increased in the LLB group compared to the control group. These results suggest that LP432 intake is capable of promoting the function of ABCG2 transporter.

*Lactobacillus plantarum*06CC2, ATP-binding cassette transporter G2, 3-indoxylsulfuric acid

講演番号：2D04-08
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 10:30～ ミーティングルーム D

Lactobacillus plantarum 06CC2 摂取による高脂肪食マウスの腸管バリア調節作用

Regulation of intestinal barrier function by *Lactobacillus plantarum* 06CC2 in mice fed high diet

○市谷 花帆[1]、宮本 侑子[1]、小野 江梨花[1]、小川 健二郎[2]、西山 和夫[1]、Tsend-Ayush Chuluunbat[3]、Oyunsuren Tsendesuren[4]、李 怡然[5]、中野 智木[5]、竹下 正彦[5]、有馬 勇夫[5]、山崎 正夫[1]([1]宮崎大農応生、[2]宮崎大 TT 推進機構、[3]蒙科技大、[4]蒙バイオ協会、[5]南日本酪農協同(株))

○Kaho ICHITANI[1], Yuko MIYAMOTO[1], Erika ONO[1], Kenjirou OGAWA[2], Kazuo NISHIYAMA[1], Chuluunbat Tsend-Ayush[3], Tsendesuren Oyunsuren[4], Yiran LI[5], Tomoki NAKANO[5], Masahiko TAKESHITA[5], Yuo ARIMA[5], Masao YAMASAKI[1] ([1]Univ. of Miyazaki, [2]Univ. of Miyazaki TT office, [3]Mongolian University of Science and Technology, [4]Mongolian Biotechnology Association, [5]Minami Nihon Rakuno Kyodo Co. Ltd)

本研究ではモンゴルの伝統的な乳製品から分離した乳酸菌である *Lactobacillus plantarum* 06CC2 (LP06CC2）が高脂肪食摂取マウスにおける腸管バリア機能に及ぼす影響を評価した。

Balb/c マウスに通常食 (NC)あるいは高脂肪食 (HF)を 8 週間投与し、さらに HF 群には LP06CC2 は食餌に 0.1 あるいは 1% (LLB、HLB)添加した 。終体重は通常群と比較して HF 群で増加傾向が認められ、LLB, HLB 群で脂肪組織重量が低下する傾向が認められた。血漿総コレステロールは、HF 群と比較して HLB 群で有意に減少した。血中エンドトキシン(LPS)濃度は NC 群と比較して HF 群で増加し、HF 群と比較して LLB 群及び HLB 群で減少した。また、腸管 ZO-1 および occludin 発現が LLB 群で上昇していた。また、HLB 群で糞中酪酸レベルが有意に増加した。糞中細菌解析において、Lactobacillales 目は HF 群で減少したが、LLB 群で NC 群を僅かに上回った。また、LLB 群は *Clostridium* subcluster XI や *Clostridium* cluster XVIII が HF 群に比べて HLB 群より上昇した。以上の結果より、LP06CC2 による高脂肪摂取マウスにおける腸管バリア保護作用が示唆された。

In this study, we evaluated the effect of *Lactobacillus plantarum* 06CC2 (LP06CC2), a lactic acid bacteria isolated from traditional Mongolian dairy products, on intestinal barrier function in mice fed a high-fat diet.

Balb/c mice were fed a normal (NC) or high-fat diet (HF) for 8 weeks, and LP06CC2 was added to the HF group at 0.1% or 1% (LLB, HLB) of the diet. The final body weight was tended to increase in the HF group compared to the normal group, and the weight of adipose tissues were slightly decreased in the LLB and HLB groups. Plasma total cholesterol was significantly reduced in the HLB group compared to the HF group. Blood endotoxin (LPS) levels were increased in the HF group compared with the NC group and decreased in the LLB and HLB groups compared with the HF group. In addition, intestinal ZO-1 and occludin expression was increased in the LLB group. Fecal butyrate levels were also significantly increased in the HLB group. Fecal bacterial analysis showed that the Lactobacillales decreased in the HF group, but slightly increased in the LLB group compared to the NC group. In addition, *Clostridium* subcluster XI and *Clostridium* cluster XVIII were elevated in the LLB group than in the HLB group compared to the HF group. These results suggest that LP06CC2 may protect the intestinal barrier in high-fat-fed mice.

Lactbacillus plantarum 06CC2, high-fat diet, intestinal barrier

講演番号：2D04-09
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 10:30～ ミーティングルーム D

Lactobacillus plantarum 06CC2 摂取による肝臓コレステロール低下作用と胆汁酸脱抱合調節作用
Modulation of bile acid deconjugation and reduction hepatic cholesterol by *Lactobacillus plantarum* 06CC2

○山崎 正夫[1]、峯崎 美歌子[1]、岩切 明日夏[1]、宮本 侑子[1]、小川 健二郎[2]、西山 和夫[1]、Tsend-Ayush Chuluunbat[3]、Oyunsuren Tsendesuren[4]、李 怡然[5]、中野 智木[5]、竹下 正彦[5]、有馬 勇夫[5]([1]宮崎大農応生、[2]宮崎大 TT 推進機構、[3]蒙科技大、[4]蒙バイオ協会、[5]南日本酪農協同(株))
○Masao Yamasaki[1], Mikako Minesaki[1], Asuka Iwakiri[1], Yuko Miyamoto[1], Kenjiro Ogawa[2], Kazuo Nishiyama[1], Chuluunbat Tsend-Ayush[3], Tsendesuren Oyunsuren[4], Yiran Li[5], Tomoki Nakano[5], Masahiko Takeshita[5], Yuo Arima[5] ([1]Univ. of Miyazaki, [2]Univ. of Miyazaki, TT office, [3]Mongolian University of Science and Technology, [4]Mongolian Biotechnology Association, [5]Minami Nihon Rakuno Kyodo Co. Ltd)

本研究ではモンゴルの伝統的な乳製品から分離した乳酸菌である *Lactobacillus plantarum* 06CC2 (LP06CC2) がマウスにおけるコレステロール代謝に及ぼす影響を評価した。Balb/c マウスに 0.50%コレステロール負荷食を 3 週間投与した。LP06CC2 は食餌に 5%添加した。血清コレステロールは高コレステロール (HCD) 群及び HCD+LP06CC2 (HCD+LAB) 群間に有意差は認められなかったが、肝臓コレステロールは HCD 群より HCD+LAB 群で有意に低く、肝臓トリグリセリド及び肝障害は HCD 群より HL 群で低い傾向が認められた。コレステロール合成の律速酵素である肝臓 Cyp7A1 発現に対して LP06CC2 の影響は認められなかった。LP06CC2 は盲腸内のタウリン抱合型胆汁酸を減少させ、糞中の総胆汁酸も低下していた。また、HL 群では糞量の増加と、糞中酪酸濃度の上昇が観察された。さらに、糞中の短鎖脂肪酸と乳酸濃度の相関関係を解析したところ、乳酸と酪酸濃度には極めて強い正の相関が認められた。以上の結果より、LP06CC2 株は胆汁酸の脱抱合促進により体内コレステロールプール低下作用があることが示唆された。

We have revealed that *Lactobacillus plantarum* 06CC2 (LP06CC2), a lactic acid bacterium isolated from a traditional Mongolian dairy product had ability to deconjugate bile acid. Here, we evaluated the effect of LP06CC2 on cholesterol metabolism in mice. Balb/c mice fed AIN-93G-based 0.50% cholesterol-loaded diet for 3 weeks. Lyophilized LP06CC2 was added to the diet at 5%. Serum cholesterol level was not significantly different between the high cholesterol (HCD) and high cholesterol diet + LP06CC2 (HCD+LAB) groups. However, liver cholesterol was significantly lower in the HCD+LAB group than in the HCD group, and liver triglycerides and liver damage tended to be lower in the HL group than in the HCD group. Ingestion of LP06CC2 did not affect on the Cyp7A1, the rate-limiting enzyme of cholesterol synthesis. Ingestion of LP06CC2 decreased cecum taurine-conjugated bile acids and total bile acids in the feces. Increase of fecal butyrate concentration was also observed in the HCD+LAB group. Correlation analysis between short-chain fatty acids in feces and lactate concentration showed a very strong positive correlation between lactate and butyrate concentration. These results suggested that the LP06CC2 strain is capable of lowering the cholesterol pool in the body by promoting the deconjugation of bile acids.

Lactobacillus plantarum 06CC2, cholesterol, bile acids

発表責任者：山崎正夫（myamasaki@cc.miyazaki-u.ac.jp）

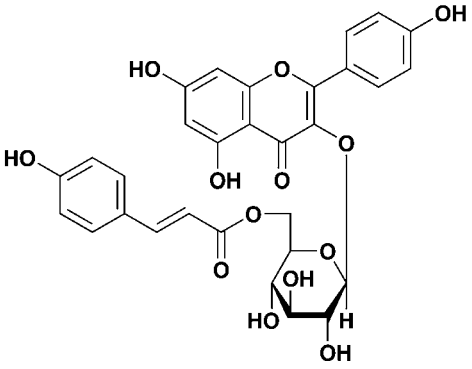
講演番号：2D04-10
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 10:30～ ミーティングルーム D

アシル化フラボノール配糖体の細胞内中性脂肪低減作用

Decreasing Effect of Acylated Flavonol Glycosides on Intracellular Triglyceride

○長友 暁史[1,2]、河野 麻実子[1]、川上 宏智[1]、二宮 清文[2,3]、森川 敏生[2,3]([1]森下仁丹（株）、[2]近畿大薬総研、[3]近畿大アンチエイジングセ)
○Akifumi NAGATOMO[1,2], Mamiko KOHNO[1], Hirosato KAWAKAMI[1], Kiyofumi NINOMIYA[2,3], Toshio MORIKAWA[2,3] ([1]Morishita Jintan Co.,Ltd., [2]Pharm. Res. Technol. Inst., Kindai Univ., [3]Antiaging Cent., Kindai Univ.)

【目的】肝臓に中性脂肪 (TG) が過剰に蓄積した脂肪肝は，生活習慣病のリスクファクターのひとつで，肥満症に高頻度で併発していることが知られており，脂肪肝の改善は肥満症やメタボリックシンドロームの予防または改善に寄与すると考えられる．我々はこれまでに，バラ科 (Rosaceae) 植物 *Rosa canina* L. の種子から単離したアシル化フラボノール配糖体 *trans*-tiliroside (**1**) がマウスにおいて体重増加抑制作用を示すことを見出した．本研究では，化合物 **1** および類似のアシル化フラボノール配糖体とその関連化合物について，ヒト hepatoblastoma 由来 HepG2 細胞を用いて細胞内中性脂肪低減作用を検討し構造活性相関を明らかにするとともに，化合物 **1** の作用機序を解析した．
【方法】HepG2 細胞を 48 穴マイクロプレートに播種し，高グルコース (4500 mg/L) DMEM (DH) で 6 日間培養後，培養液を被験物質を添加した低グルコース (1000 mg/L) DMEM に交換し，さらに 20 時間培養した．培養終了後に超音波処理により細胞を破砕し，TG 濃度およびタンパク質濃度を定量した．加えて，各種阻害剤の併用およびウエスタンブロット法にて作用機序を推定した．
【結果】DH で培養することにより，HepG2 細胞内に TG が蓄積した．化合物 **1** および類似のフラボノール配糖体は細胞内に蓄積した TG を濃度依存的に減少させた．構造と活性の関係から，配糖体の 6″ 位に結合したアシル基の存在が活性発現に必須であり，アシル基の構造が活性に影響することが明らかになった．化合物 **1** の活性はホルモン感受性リパーゼ (HSL) 阻害剤 CAY10499 との併用により減弱したことから，活性発現には HSL が関与していることが示唆された．



trans-tiliroside (**1**)

Fatty liver is one of the risk factors for lifestyle-related diseases, and its amelioration is thought to contribute to the prevention or improvement of obesity and metabolic syndrome. We have revealed that an acylated flavonol glycoside, *trans*-tiliroside (**1**), decreases intracellular triglyceride in HepG2 cells. The results from various related compounds indicated that the acyl group at the 6″ position in the D-glucopyranosyl part was essential for the activities. In addition, the activity of **1** was attenuated in the presence of the HSL inhibitor CAY10499, suggesting that HSL is involved in the expression of activity of **1**.

trans-tiliroside, HepG2, fatty liver

発表責任者：森川敏生（morikawa@kindai.ac.jp）

講演番号：2D04-11
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 10:30～ ミーティングルーム D

ヒト腸内細菌叢培養モデルの小型化

The study of the simulating method of bacterial community using human fecal.

石川 愛花、○稲垣 瑞穂 (岐阜大応生)
Manaka ISHIKAWA, ○Mizuho INAGAKI (Gifu Univ)

【目的】腸内細菌を理解するには，腸内細菌全体を一つのコミュニティとして捉え，その動態を評価することも必要である。当研究室では，100 mL 腸内環境再現モデル（Kobe University Human Intestinal Microbiota Model: KUHIMM）を用いた研究を行ってきた。本研究では，反復試験が可能な評価系にするため，細胞培養用 24 ウェルプレートを用いた培養方法の検討を行った。
【方法】Gifu Anaerobic Medium 培地を調製した。滅菌後，培地は降温しながら N_2:CO_2=8:2 のガスに十分に置換し，糞便希釈液を植菌した。24 ウェルプラスチックプレートに植菌済みの培地を 1 mL ずつ分注し，アネロパックと一緒に角ジャーに入れて密閉し，培養を行った。対照として，同じ糞便希釈液を用いた 100 mL 培養を実施した。培養液は，主要 5 種の有機酸解析，次世代シーケンサー解析を行った。岐阜大学医学倫理審査委員会 承認 No. 2018-032
【結果】プレートを角ジャーに密閉した後に 3 つの検証-静置培養（検討①），旋回培養（検討②），密閉から 20 分ほど静置した後に旋回培養（検討③）-を行った。検討③の手順が，有機酸の構成比，細菌叢の主成分分析ともに，対照培養に類似していた。糞便の代わりに単菌を播種して培養液 pH の経時変化を観察したところ，1 mL 培養は 100 mL 培養よりも発酵が遅くなる傾向が示唆された。

【Objective】To improve the method of simulation of the human microbiota in 1 mL medium.
【Method】Fecal sample was inoculated in deoxidation treated GAM medium, then 1 mL of the inoculated medium was dispensed into a 24-well plastic plate, which placed in a container with anaerobic pack agent (deoxidation and carbon dioxide generator), sealed, and cultured. The sample was analyzed by measurement of short-chain fatty acid levels and 16S rRNA gene amplicon sequencing.
【Result】After sealing, the container keeps at 37℃ for approximately 20 min was a need. The progression of microbiota fermentation in a 1 mL medium was delayed than a 100 mL medium.

bacterial community

発表責任者：稲垣瑞穂（mizuho@gifu-u.ac.jp）

講演番号：2D04-12
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 10:30～ ミーティングルーム D

未消化コーヒー焙煎豆の機能性

Functions of undigested-coffee beans

○武井 実花、TATIYANUKUL Chalinee、田中 航、榊原 啓之（宮崎大農）
○Mika TAKEI, Chalinee TATIYANUKUL, Wataru TANAKA, Hiroyuki SAKAKIBARA (Univ. Miyazaki)

コーヒーは，コーヒーノキの種を加熱加工した焙煎豆を挽いた粉末から，湯または水で抽出した飲料であり，嗜好飲料として世界中で飲用されている。また，コーヒーには抗酸化活性を有するクロロゲン酸などのポリフェノール類が豊富に含まれているため，その摂取には生体調節効果も期待できる。一方で，コーヒーの風味や含有成分は，コーヒーノキの品種，産地，生豆の処理，焙煎の方法や程度，粉砕粒の大きさなどの様々な要因によって変化する。我々は，特徴的な方法を用いて生豆を処理する未消化コーヒーに着目した。未消化コーヒーは，ジャコウネコやゾウが食べたコーヒーノキの果実が，未消化のままフンと一緒に排泄された種を焙煎することで得られる。本研究では，コーヒーの機能性に与える消化過程の影響について比較した。

5 種の焙煎コーヒ豆，ジャコウネコ由来未消化コーヒー（KL），ゾウ由来未消化コーヒー（BI），グアテマラ，コロンビア，キリマンジャロを 90％メタノール抽出し，総ポリフェノール量，カフェインやクロロゲン酸量，抗酸化活性（DPPH ラジカル消去活性）等を比較測定した。

KL の総ポリフェノール量は，他 4 種と比較して有意に高値を示した。抗酸化活性とクロロゲン酸量も同様に KL で高値を示した。以上の結果から，未消化コーヒーの KL の機能性が高いことが示されたが，BI の効果と比較すると，未消化の作用は動物種によって異なる可能性があると考えた。

In this study, we evaluated the effects of digestion process on function in coffee beans.

Following five roasting coffee beans were employed: Kopi Luwak (KI, undigested coffee beans obtained from civet cats), Black Ivory (undigested coffee beans obtained from elephant), Guatemala, Colombia and Kilimanjaro. Individual coffee beans were extracted with 90% methanol, and then analyzed total polyphenol amounts, antioxidant activity using DPPH radical scavenging method, and Chlorogenic acid amounts using HPLC-PDA system.

Total polyphenol amounts existed in KI were significantly higher comparing with the other four coffee beans. Antioxidant activity and chlorogenic acid amounts also indicated similar tendency. In conclusion, undigested process imply to stimulate the functions existed in coffee beans, although their effects might be affected by the animal species.

coffee, chlorogenic acid, undigested

講演番号：2D04-13
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 10:30～ ミーティングルーム D

α-EG 食事試験によるコラーゲンスコアへの影響

Effect of dietary intake test on collagen score

○中嶋 唯人[1]、柳田 茉子[2]、宮島 誠治[3]、尾関 健二[1,2]([1]金沢工業大学、[2]金沢工業大学　大学院、[3]米沢電気工事株式会社)
○ Yuito NAKASHIMA[1], Mako YANAGIDA[2], Seiji MIYAJIMA[3], Kenji OZEKI[1,2] ([1]Kanazawa Institute Of Technology, [2]Kanazawa Institute Of Technology graduation school, [3]Yonezawa Electrical Engineering Company Limited)

【背景・目的】α-エチル-D-グルコシド（以下 α-EG）は日本酒特有の並行複発酵により生産され、肌質改善効果をもつ。また、ヒト飲用試験では純米酒（α-EG 濃度:320 mg/日）を 2 週間飲用することで、肌のコラーゲン密度が 2 週目で有意に上昇し、その後もコラーゲン密度が上昇する継続性が認められた[1)]。そこで本研究では、α-EG 高含有みりん（α-EG:3.1%）を使用した食事を 6 日間摂取してもらい、肌のコラーゲン密度に与える影響を検証する事を目的とした。
【方法・結果】被験者（男性：4 人、女性 5 人）に α-EG 高含有みりん（α-EG 量:1.24~2.48 g/1 食）を使用した食事を 6 日間摂取してもらった。コラーゲン密度の測定は Derma Lab combo を用い、食事試験開始日から週単位で両前腕のコラーゲン密度を測定した。結果として、被験者全員のコラーゲンスコアが 0 週目と比べて有意に増加し、全体平均としては 1 週目で 12 ポイント、2 週目で 13 ポイント有意に上昇した。このことから食事からの α-EG の摂取にコラーゲン密度増加の即効性と継続性が認められ、調理による α-EG でも有効であることがわかった。

1) 三井雅紀ら: 日本生物工学会 2018 年度大会講演要旨集, 2Cp08 (2018)

[Background/Purpose] Ethyl-α-D-Glucoside (α-EG) is produced by multiple parallel fermentation and has the effects of improving skin quality. In the human intake test of *Junmai-shu* (α-EG: 320 mg/day), collagen density of the skin was increased in 2 weeks, it showed the immediate and continuity of effects by α-EG [1)]. In this study, we examined the effects of increasing collagen density by α-EG from the meals using α-EG high containing -*mirin* (α-EG: 3.1%).
〔Methods/Results〕 Volunteers (4 males, 5 females) took a meal using α-EG high containing *mirin* (α-EG: 1.24 ~ 2.48 g / meal) for 6 days. The collagen density of both forearms was measured using Derma Lab combo weekly on the start date of the intake test. As a result, the collagen density of all volunteers increased significantly compared to the 0th week. In conclusion, it was shown that the intake of α-EG from the meal had immediate and continuity effects of increasing collagen density.

1) M.Mitsui *et.al*, *Biosci.and Bioeng*. Conference Program and Abstract, 2Cp08, (2018)

α-EG, collagen score, multiple parallel fermentation

発表責任者：中嶋唯人（b1744691@planet.kanazawa-it.ac.jp）

講演番号：2D04-14
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 10:30～ ミーティングルーム D

AhR の活性化による肝臓の脂質蓄積における時計遺伝子の関与とフラボノイドによる抑制効果

Involvement of circadian clock in AhR-induced fatty liver and prevention effect of flavonoids against AhR activation

○北風 智也、野村 拓也、芦田 均（神戸大院・農）
○Tomoya KITAKAZE, Takuya NOMURA, Hitoshi ASHIDA (Kobe Univ.)

末梢組織には約 24 時間周期の概日リズムが存在し、この乱れは脂肪肝などの生活習慣病に繋がる。芳香族炭化水素受容体（AhR）は環境汚染物質であるベンゾピレン（BaP）などによって活性化され、肝臓への脂質蓄積や概日リズムの乱れを引き起こすが、これらの関係性は不明である。そこで本研究では、AhR を介した肝臓脂質蓄積における BMAL1 の関与を検討するとともに、フラボノイドによる保護効果の検証を行った。マウス肝がん由来 Hepa1c1c7 細胞に 1 μM のデキサメタゾンを 2 時間作用させることで概日リズムを同調させた後、1 μM の BaP を作用させ *Bmal1* の発現量を経時的に測定した結果、BaP によって発現振幅が低下した。AhR のノックダウン及び阻害剤は BaP による BMAL1 の発現減少をキャンセルした。また、BaP は脂質蓄積を誘導し、AhR のノックダウン及び阻害剤によりこの脂質蓄積は抑制された。BMAL1 をノックダウンした結果、BaP による脂質蓄積は観察されなかった。REV-ERBα は RORE を介した転写活性を負に制御することから、BaP による脂質蓄積における REV-ERBα の関与を検討した。その結果、REV-ERBα 阻害剤は BaP による脂質蓄積や BMAL1 の発現減少をキャンセルした。AhR のアンタゴニストであるルテオリンやケンフェロールは、BaP による RORE を介した転写活性の低下とそれが誘導する BMAL1 の発現量の減少を回復させた。

Circadian rhythms play important roles in physiology and behavior. BMAL1 is a principal driver of a molecular clock and is repressed by REV-ERBα. It is known that circadian disruption causes various lifestyle diseases. Aryl hydrocarbon receptor (AhR) is a transcriptional factor responding to its ligands, polycyclic aromatic hydrocarbons including BaP. AhR causes various adverse effects such as fatty liver and circadian disruption. However, their relationship has not been understood yet. We investigated the involvement of circadian disruption in AhR-caused fatty liver. To induce the oscillation in the expression of clock genes in Hepa1c1c7 cells, dexamethasone at 1 μM was treated to the cells for 2 h. Then, BaP at 1 μM was treated to the cells for another 0-48 h. BaP reduced amplitude of the expression of *Bmal1*. BaP-reduced BMAL1 was canceled by the inhibitors of AhR and REV-ERBα. B[a]P induced lipid accumulation in Hepa1c1c7 cells, but the elimination of either AhR or BMAL1 canceled It. Luteolin and kaempferol, the AhR antagonists, suppressed BaP-reduced BMAL1 expression. In conclusion, we found that the activation of AhR caused the reduction of BMAL1 expression and circadian disruption by activating REV-ERBα, resulting in fatty liver, and luteolin and kaempferol are useful for prevention of AhR-caused circadian disruption.

aryl hydrocarbon receptor, circadian rhythm, flavonoids

講演番号：2D04-15
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 10:30～ ミーティングルーム D

フルクトオリゴ糖摂取ラットの大腸 ALP 活性誘導をはじめとする腸内環境変動に対する脂肪摂取量の影響

Effects of dietary fat levels on the induction of colonic ALP activity and the modulation of gut luminal environment in rats fed fructo-oligosaccharides

○岡崎 由佳子、尾崎 舞、鈴木 毬那、東海林 綾香（藤女子大人間生活）
○Yukako OKAZAKI, Mai OAZKI, Marina SUZUKI, Ayaka SHOJI (Fuji Women's Univ.)

近年，小腸のアルカリホスファターゼ（ALP）は抗炎症作用，メタボリックシンドローム予防作用，食品因子による誘導といった観点から研究が進められている。我々は，水溶性食物繊維や難消化性オリゴ糖類が共通して，高脂肪食摂取ラットの ALP 活性と遺伝子（*IAP-I*）発現を大腸特異的に増加させることを明らかにし，この上昇作用が腸管バリア機能の指標である糞中 Mucin 含量と正の相関関係にあることや，腸内細菌叢および盲腸有機酸含量の変動と関連性がある可能性を示してきた。また，オリゴ糖による大腸 ALP 誘導作用は摂取する脂肪の種類により異なり，特にラード食の条件で顕著なことを明らかにした。本研究では，脂肪摂取量の違いがオリゴ糖摂取ラットの大腸 ALP 活性と他の腸内環境関連因子への影響について検討を加えた。

実験動物として SD 系雄ラットを用いた。実験食として実験 1 では 5%または 30%ラード食を，実験 2 では 5%または 30%大豆油食を用い，それぞれの飼料に 4%フルクトオリゴ糖（FOS）をセルロースに置き換えて 14 日間飼育した。その結果，実験 1 と 2 において，FOS 無添加食群では食餌脂肪量の違いによる大腸 ALP 活性および他の腸内環境関連因子への顕著な影響は認められなかった。実験 1 の結果より，高ラード食では FOS 添加により盲腸内容物と大腸の ALP 活性，大腸 *IAP-I* 発現が有意に増加したが，低ラード食では同様の影響は認められなかった。また，FOS 摂取による糞と盲腸内容物中の Mucin 含量，盲腸内容物酪酸含量の増加，および *Clostridium coccoides* の低下も低ラード食と比較して高ラード食で顕著だった。実験 2 も同様に，高大豆油食で FOS 摂取による大腸 ALP 活性誘導や Mucin 含量増加作用が高まることが示された。以上より，FOS よる大腸 ALP 活性をはじめとする腸内環境関連因子への影響は，脂肪添加量が高い条件下で顕著である可能性が示された。

This study aims to investigate whether dietary fat levels influence the effect of oligosaccharides on colonic ALP activity and the luminal environment in HF-fed rats. Male SD rats were fed a diet containing 5% or 30% lard or soybean oil with or without 4% fructo-oligosaccharides (FOS) for 14 days. In rats that did not receive FOS, colonic ALP activity and the gene expression did not differ regardless of dietary fat levels. Dietary FOS significantly elevated ALP activity in colon and cecal digesta, and colonic expression of *IAP-I* in the high-lard diet groups, but not in the low-lard diet groups. The increase in mucins and n-butyrate in cecal digesta, and the decrease in *clostridium coccoides* by FOS was prominent in the high-lard diet groups. The effect of high-soybean oil diet with FOS on colon ALP activity and mucins was similar to that of the high-lard diet with FOS.

Alkaline phosphatase, Dietary fat level, Rats

講演番号：2D07-01
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 13:30～ ミーティングルーム D

高圧酵素処理肉エキスにおける機能性成分簡易分析法の検討

Examination of a Simplified Analysis Method for Functional Components of Meat Extracts Treated with High Pressure and Enzymes

○小木曽 加奈[1]、古田 一匡[2] ([1]長野県立大健康発達、[2]富士通株式会社)
○Kana KOGISO[1], Kazumasa FURUTA[2] ([1]The Univ. of Nagano, [2]Fujitsu LTD.)

日本では鳥獣による被害は毎年 200 億円ほどである。近年、捕獲後の野生動物は、地方振興の有望な食資源として注目されるようになってきた。これまで我々はシカ肉やイノシシ肉について付加価値のある製品開発として、高圧酵素処理でエキス化を行ってきた。これまでのエキスの成分分析では、遊離アミノ酸分析装置を用いるなどの手間と時間がかかる。そのため、別の簡易な方法で成分を測定できるかの検討を行い、エキスの色について知見が得られたので報告する。シカ肉やイノシシ肉は各種市販のタンパク質分解酵素 3 種類を添加し、50℃、2000 気圧、24 時間保持しエキス化した。イミダゾールペプチド分析には遊離アミノ酸分析装置を用いた。イミダゾールペプチド量と色の関係について検討するために、エックスライト社製色差計 X-liteRM200QC を用い、各種エキスについて CIE L*a*b*値を測定した。各種肉エキスについてイミダゾールペプチドを検討したところ、色差計の値とアンセリン量に逆相関がみられた。以上のことから遊離アミノ酸分析を行わなくても、色差計で簡易にアンセリン量を計測できる可能性が示された。なお、本研究は科研費（20K02345）の助成を受けた。

In Japan, damage caused by birds and animals is about 20 billion yen every year. In recent years, wild animals after capture have been attracting attention as a promising food resource. In order to develop value-added products from deer and wild boar meat, we have been extracting them by high-pressure enzymatic treatment. The analysis of the components of the extracts requires a lot of time and effort, including the use of free amino acid analyzers. Therefore, we examined whether we could measure the components using another simple method, and we report on our findings on the color of the extract. Deer and wild boar meat were extracted by adding three commercially available proteolytic enzymes and kept at 50°C, 2000 atm, for 24 hours. Free amino acid analyzer was used for imidazole peptide analysis. To investigate the relationship between the amount of imidazole peptide and color, the CIE L*a*b* values of various extracts were measured using a colorimeter. When imidazole peptide was examined in various meat extracts, there was an inverse correlation between the colorimeter values and the amount of anserine. These results indicate that it is possible to measure the amount of anserine simply by colorimeter without analyzing free amino acids. This work was supported by Grant-in-Aid for Scientific Research(C) (20K02345).

gibier, imidazole peptide, color

発表責任者：小木曽加奈（kogiso.kana@u-nagano.ac.jp）

講演番号：2D07-02
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 13:30～ ミーティングルーム D

乾熱処理脱脂粉乳の酸ゲル化能について

Acid induced gelation of dry heat treatment on skimmed milk powder

○小野 航[1]、岡 大貴[2]、辻井 良政[2]、野口 智弘[1]、髙野 克己[2]([1]東京農大応生・食加技セ、[2]東京農大応生・農化)
○Wataru Ono[1], Daiki Oka[2], Yoshimasa Tujii[2], Tomohiro Noguchi[1], Katsumi Takano[2] ([1]Tokyo Univ. of Agric, FPC, [2]Tokyo Univ. of Agric, Agric. Chemi.)

Low Heat (LH) 系脱脂粉乳はヨーグルト製造において乳固形分を調整し、ゲル形成性を向上させるために古くからヨーグルトミックスに配合され利用されている。近年、ヨーグルトのゲル化能向上に関する研究が様々行われているが、我々は LH 系脱脂粉乳に対して乾熱処理を施すことで酸ゲル化能が向上することを見出した。65℃、RH8.0%にて 6 日間乾熱処理を施した LH 系脱脂粉乳を、タンパク質含量 4%になるように純水に分散後、グルコノ-δ-ラクトンを 1.84%添加しゲルを調製した。乾熱処理脱脂粉乳ではゲルの破断強度が 112.7mN を示し、未処理の脱脂粉乳の 80.5mN と比較して有意に高い値を示した。そこで乾熱によるカゼインの状態変化を SDS-PAGE およびゲル濾過クロマトグラフィーに供し解析したところ、SS 結合以外の共有結合によるカゼイン凝集体の生成が確認された。また、動的光散乱法を用いてカゼインミセルの粒子径を測ったところ、粒子径に変化はなかった。以上のことから、LH 系脱脂粉乳を乾熱処理することで、カゼインミセル内部が架橋されることが示唆された。

Low Heat (LH) skimmed milk powder has been used in yogurt mixes to adjust milk solids and to improve gel formation in yogurt productions. In recent years, various studies have been conducted on improving the gelling ability of yogurt. We found that the acid gelation is improved by dry heat treatment on LH skimmed milk powder. LH skimmed milk powder was dry-heated at 65℃, RH 8.0% for 6 days, the powder was dispersed in deionized water to 4% protein concentration. Acid gel was prepared by 1.84% of glucono-δ-lactone addition in the dispersion. As a result, the skimmed milk powder of dry-heated showed breaking loads of 112.7mN, and the breaking loads was significantly increased as compared with the untreated skim milk powder of 80.5mN. Focusing on the denaturation of casein by dry heat, SDS-PAGE and Size Exclusion Chromatography were used for analysis. The analysis revealed aggregation of casein due to covalent bonds other than SS bonds. Moreover, the particle size of casein micelles was measured using a Dynamic Light Scattering method, there was no change in the particle size. From the above results, it was suggested that the dry heat treatment of LH skimmed milk powder would crosslink the inside of casein micelles.

skimmed milk powder, dry heat treatment, acid gelation

発表責任者：小野 航（wo207529@nodai.ac.jp）

講演番号：2D07-03
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 13:30～ ミーティングルーム D

乳化イサダオイル噴霧乾燥粉末中のエイコサペンタエン酸、およびドコサヘキサエン酸の安定性

Stability of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid in spray-dried powder of emulsified Isada oil

フェルミン アントニオ[1]、高重 至成[1]、アフロザ スルタナ[1]、安達 修二[2]、○吉井 英文[3]([1]香大農、[2]京都先端大、[3]摂大農)

Antonio Fermin[1], Shisei Takashige[1], Afroza Sultana[1], Shuji Adachi[2], ○ Hidefumi Yoshii[3] ([1]Kagawa Univ., [2]Kyoto Univ. Adv. Sci, [3]Setsunan Univ.)

イサダオイルは、エイコサペンタエン酸（EPA）、ドコサヘキサエン酸（DHA)の高度不飽和脂肪酸、アスタキサンチン、8-ヒドロキシエイコサペンタエン酸を含有し、その生理活性が注目されている。本研究では、マルトデキストリン（MD, デキストロース当量=19）を賦形剤、乳化剤としてキラヤニン、抗酸化剤としてアスコルビン酸ナトリウム、ローズマリー抽出オイル（RO）を用いて噴霧乾燥するための乳化溶液を、機械的乳化、高圧乳化により乳化し噴霧乾燥粉末中の油滴径が異なるイサダオイル包括粉末を作製した。この粉末を、アルミパウチに入れ貯温度 25、50、および 70℃で貯蔵し、粉末中の EPA,DHA の安定性を及ぼす油滴径の影響について検討した。

イサダオイルは、乳化剤としてキラヤニンを用いて均一なエマルションを作製できた。機械的乳化後100MPaの高圧乳化した場合平均油滴径が0.48μmと小さく微細な油滴径をもつ粉末が作製できた。機械的乳化した場合粉末中の油滴径は、1.0-17μmであった。噴霧乾燥直後の噴霧乾燥粉末中のEPAおよびDHAの残留率は、高圧乳化に供された噴霧乾燥粉末はそれぞれ99%および100%であった。 室温（25° C）で6か月間貯蔵した後のEPA, DHAの残留率は、80%を超えていた。 しかし、50° Cで6か月間貯蔵した後のこれらの残留率は、それぞれ約5%と0%でした。 各粉末中のEPAの残留率は、貯蔵温度25、50、および75℃の場合それぞれ機構定数n＝0.085、1.85、1.1を用いたAvrami式（Weibull式）で相関できた。

【謝辞】本研究は、農研機構（生研支援センター）の 2017~2019 年度**「革新的技術開発・緊急展開事業（うち経営体強化プロジェクト）」の一部として実施した。**

Krill oil (Isada oil) from Pacific krill (Euphausia pacifica) has high contents of polyunsaturated fatty acids (PUFAs) and phospholipids. Emulsified KO was encapsulated with maltodextrin (dextrose equivalent = 19) and Quillaja saponin as emulsifiers. The retentions of eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) in the spray-dried powders were 99% and 100%, respectively. Those retentions after 6 months of storage at room temperature (25 °C) were over 80%. However, such retentions after 6 months of storage at 50 °C were approximately 5% and 0%, respectively.

Funding This research was supported by grants from the Project of the NARO Bio-oriented Technology Research Advancement Institution (a special scheme project on vitalizing management entities of agriculture, forestry, and fisheries).

spray drying, EPA, Isada oil

講演番号：2D07-04
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 13:30～ ミーティングルーム D

亜臨界水中での希少糖の合成に及ぼす緩衝液とアルコールの影響

Effect of the buffer and alcohol on the formation of rare sugars in subcritical water

○尾西 佑一朗[1]、古城 侑也[1]、安達 修二[2]、谷 史人[1]、小林 敬[1] ([1]京都大院農、[2]京都先端科学大)
○ Yuichiro ONISHI[1], YUYA FURUSHIRO[1], SYUJI ADACHI[2], FUMITO TANI[1], TAKASHI KOBAYASHI[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Kyoto Univ Adv Sci.)

亜臨界水は加圧条件で液体として存在する水であり、酸または塩基触媒として働く。ガラクトース水溶液を亜臨界水処理すると、ガラクトースの異性化が起こり、タガトースとタロースが生成する。しかし、水中の処理では、異性化糖の収率は著しく低い。本研究では、リン酸緩衝液と有機溶媒の混合液中で異性化を行い、異性化した糖の収率の改善の可能性を検討した。

ガラクトースをエタノールなどの種々のアルコールとリン酸緩衝液の混合溶液に溶解した。この糖溶液を管型反応器に通液し、100~160℃で亜臨界水処理を実施し、HPLC で定量した。

ガラクトースの分解に関しては、エタノール濃度による影響はあまり見られなかった。一方で、エタノール濃度の上昇に伴い、タガトース収率は改善した。また、高温（160℃）ではガラクトースの反応速度は上昇したが、タガトースの分解も促進され、収率は低下した。しかし、低温（120℃）では反応速度が低下し、タガトース収率が低下した。種々のアルコールとリン酸緩衝液の混合液中での反応を実施した。その結果、2-プロパノールを除く各アルコールについて、リン酸緩衝液中での反応に比べてタガトース収率は改善したものの、エタノール以上の改善は見られなかった。2-プロパノールと緩衝液の混合液中では、緩衝液に比べてタガトース収率が低下した。また、エタノールとリン酸緩衝液中での反応について速度解析を実施中である。

When an aqueous galactose solution is treated under subcritical water conditions, galactose isomerizes to rare sugars, tagatose and talose. However, the yield of isomerized sugars in pure water is significantly lower. In this study, isomerization was performed in a mixture of phosphate buffer and organic solvents to improve the yield of rare sugars.

Galactose was dissolved in a mixed solution of various alcohols and phosphate buffer. The solution was passed through a tubular reactor thermostated at 100–160°C.

The degradation of galactose was rarely affected by the ethanol addition. On the other hand, the tagatose yield improved with increasing ethanol concentration. Several alcohols were also applied to improve the tagatose yield. The results showed that the addition of alcohols except for 2-propanol improved the tagatose yield. Kinetic analysis of the isomerization of galactose in the mixture of ethanol and phosphate buffer is now underway.

subcritical water, rare sugar, isomerization

発表責任者：小林　敬（kobayashi.takashi.6w@kyoto-u.ac.jp）

講演番号：2D07-05
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 13:30～ ミーティングルーム D

高圧熱水処理によるタンパク質の部分分解反応の速度論的解析

Kinetic analysis of the degradation reaction of proteins by hot-compressed water treatment

○布川 真帆[1]、石川 大太郎[2]、藤井 智幸[1] ([1]東北大農、[2]福島大農)
○Maho NUNOKAWA[1], Daitarou ISHIKAWA[2], Tomoyuki FUJII[1] ([1]Tohoku Univ., [2]Fukushima Univ.)

【背景・目的】高圧熱水処理はタンパク質の部分分解を行う手法として注目されている。食品中のアレルゲンタンパク質を高速で分解することができれば低アレルゲン食品を製造することが可能となる。そこで、モデルタンパク質として卵白リゾチームの部分分解反応の速度論的解析を試みた。
【方法】試料として精製リゾチームを選んだ。恒温器内に設置したステンレスパイプを反応器とし、これに HPLC ポンプと背圧調節弁を用いて反応器内圧力を保持した。得られた部分分解試料についてニンヒドリン比色法によりタンパク質モル濃度を定量し、反応初速度 r [mol/(l·s)]を求めた。
【結果・考察】リゾチーム水溶液に 160～220℃、5～25 MPa の高圧熱水処理を施した。反応液中のタンパク質モル濃度は、処理温度、滞留時間に依存して増加したことから、高圧熱水処理によってリゾチームが加水分解されたことが示された。反応初速度はいずれの温度条件においても原料濃度に比例したことから、原料濃度に関して一次反応であることが示された。故に一次反応を仮定して反応速度定数を求めた。得られた反応速度定数はアレニウスの式によって良好に記述され、リゾチームの部分分解反応の活性化エネルギーは 5 MPa の時 106.4 kJ/mol、前指数因子は 3.01×10^{9} s^{-1} となった。

【Introduction】The hot-compressed water treatment has been attracting attention as a method for partial degradation of proteins. If allergen proteins in foods can be decomposed, low allergen foods can be produced. Therefore, we focused on kinetic behavior of the partial degradation reaction of proteins.
【Materials and methods】Egg white lysozyme was selected as a model protein. A stainless pipe installed in an oven was used as a reactor. An HPLC pump and back pressure regulator were used to maintain the pressure inside the reactor. The peptide concentration of the sample was determined by the ninhydrin method, and the initial degradation rate r [mol/(l·s)] was determined from the data on a steady-state experiment.
【Results and discussion】The lysozyme solution was treated with hot-compressed water at 160 to 220 °C and 5 to 25 MPa. The peptide concentration in the solution increased depending on the treatment temperature and residence time. Therefore, it was found that lysozyme was hydrolyzed by hot-compressed water treatment. Since the initial degradation rate was proportional to the sample concentration under all temperature conditions, it was shown that the degradation was the first-order reaction for the sample concentration. Therefore, the rate constants were calculated assuming the first-order reaction. The rate constants were well described by the Arrhenius equation, and the activation energy and the pre-exponential factor were 106.4 kJ/mol and 3.01×10^{9} s^{-1} at 5 MPa.

hot-compressed water, lysozyme, degradation reaction

発表責任者：布川 真帆（maho0930@gmail.com）

講演番号：2D07-06
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 13:30～ ミーティングルーム D

フード３D プリンタと AI を活用した次世代食感分析法と製造方法開発

Development of Next Generation food texture analysis and manufacturing methods using Food 3D printer and machine learning

○武政 誠、清水 純平（東京電機大）
○Makoto TAKEMASA, Junpei Shimizu (Tokyo Denki Univ.)

食は栄養源であるばかりか、食産業、さらには食文化を通して社会を発展させる原動力である。天然物をカットして混合し、また加熱調理するという太古から続く調理法に対して、新しい方向性が模索されている。化学反応や自己組織化を積極的に利用して、分子レベルで調理を行う、分子調理学の概念も確立しており、ビルドアップ式の調理で新しい食の製造、および分析が近い将来可能になると期待される。食感は、特に1μm～1mm程度の空間スケールにおける不均一構造に起因している、と考えられる。一方、この「各空間スケールにおいて、構造をどのように設計して製造するか、またそれらをどのように評価するか？」が食品工学分野における大きな課題として残っている。その解のひとつとして、3Dプリンタを利用した次世代製造法を我々は模索している。食感の造形可能域拡大のためには装置開発、フードインク開発が必須であり、各々要素開発を進めている。食品の多様な食感を再現したり、新規の食感を造形するためには、多様なレオロジー特性がフードインクに要求される。また各々に対応した造形制御がプリンタ側にも求められるため、レオロジー特性に合わせた造形制御の取り組みなど、多方面での開発をおこなっている。食感分析についてはテクスチャーアナライザで得た結果を、多変量解析で評価する方法が数十年活用されているが、前述の空間スケールでの、不均一性は必ずしもこの従来法では評価できないケースが多々存在する。我々は機械学習を応用して、食感分析が従来困難であった食品についても評価可能とする手法開発に取り組んでいる。例として、ヒトでは判別が困難なわずかな食感の違いについても、スナック菓子などに対しても判別を可能にすることに成功した。本研究では食感の機械学習分析を、フード３Dプリンタへの応用する展望についても紹介する。

As next-generation food production method, and food texture analysis, food 3D printing system was developed to control / to produce food texture based on inhomogeneous internal structure of the food object printed by the food printer. A new food texture analysis method was developed based on machine-learning to adopt complicated texture, such as multiple rupture behavior with huge variations. By combined 3D printing and ML-based texture analysis, both production and analysis will be handled in more detailed compared with the current methods.

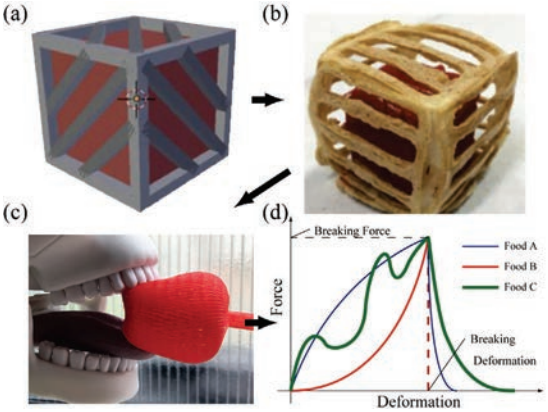


Fig.1 (a) Desinged food structure, (b) printed food using food 3D printer, (c) texture analysis, and (d) analysis based on machine learning using all the force data points aquired by texture analyzer.

Food texture, Food 3D printing, Machine learning

発表責任者：武政誠（takemasa@mail.dendai.ac.jp）

講演番号：2D07-07
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 13:30～ ミーティングルーム D

フード３D プリンタで作り込む不均一構造により食感を創出する

Food texture design originating heterogeneous structure made by food 3D printer

○清水 純平、武政 誠（東京電機大）
○JUNPEI SHIMIZU, MAKOTO TAKEMASA (Tokyo Denki Univ.)

食のおいしさのうち、６割超は食感が支配するとも言われており、我々の食を豊かにし、食文化を通して社会を発展することに貢献している。食感は多くの場合で、食品中の空間的な不均一構造に起因する。この不均一構造は調理などで多少変化するとはいえ、多くは天然物、動植物の生体内で自己組織化により構築されたnm, μm, mmスケールの不均一構造がそのまま食感に反映される。これらの構造を設計通りに、食材を分子レベルで材料配置を行うことができれば、天然物を利用した食品が有する食感を再現可能になると期待される。本研究では、フードインクのレオロジー特性を増粘多糖類やゲル化剤の利用によって制御することで、我々が開発したフード３Dプリンタにより不均一構造を食品として造形することに成功した(Fig.1)。多層構造、ブロック状構造(Fig1c)、さらには建築物における鉄筋に相当する構造など、様々な構造を作り分けることに成功している。各造形物に対して、テクスチャーアナライザによる食感評価測定を行ったところ、各層の厚みやフードインクのレオロジー特性によって、造形物の食感を制御可能であった。多層構造では層の面全体を押す方向に圧縮を行ったが、別の異方性評価として、圧縮方向と並行に柱状の構造を造形することでも、異なる食感を創生可能であり、プリントした食品の内部構造でも食感を制御できることが確認された。市販のフード３Dプリンタでは、比較的「やわらかい」フードインクしか押し出せず、必然的に介護食など柔らかい食品しか造形ができず、見た目のフォーカスせざるを得ないケースが多いが、対象をより広範囲に拡大すべく、「かたい」食品の造形にも取り組んだ。本発表では、異方性を有する構造をプリントし、主に加熱による硬化と食感への影響について調べた結果を報告する。

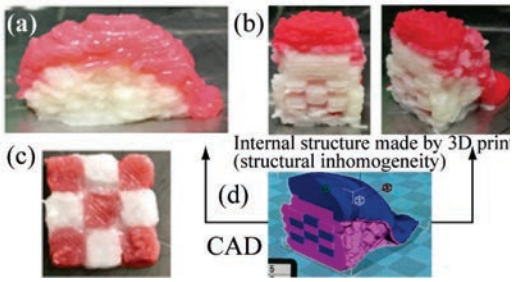


Fig.1 Typical printed 3D food objects. (a) Sushi based on protein- and carbohydrate-based food ink, and (b) the printed structure inside the sushi as designed to control the food texture, (c) Typical block structure printed with food 3D printer to build rheological heterogeneity fabricated by using two food ink. (d) the original 3D model designed in the PC for the printing objects, a and b.

Food 3D printer was developed to produce the controlled food texture as designed by making heterogeneous internal structure of the printed object, as shown in Fig.1. The effect of the typical heterogeneous structure on the food texture, such as multi-layered, and pillar structures were investigated, and the effect of heating to make the printed objects harder was also investigated.

food 3D printing, food texture, structural inhomogeneity

発表責任者：武政誠（takemasa@mail.dendai.ac.jp）

講演番号：2D07-08
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 13:30～ ミーティングルーム D

フード３D プリンタ向けフードインクに求められるレオロジー特性

Rheological properties required for food ink used in the food 3D printer

○渡邊 健太、清水 純平、武政 誠（東京電機大学）
○Kenta WATANABE, Junpei Simizu, Makoto Takemasa (Tokyo denki Univ.)

３D プリンタは迅速かつ安価に複雑な形状を製造可能にする技術として、モノづくりの革命をおこしており、近年では次世代食品製造技術としても注目を集めている。熱可塑性樹脂用積層造形方式３D プリンタをベースに我々が開発したプリンタを利用しながら、各種フードインクを開発し、造形精度を向上させるために必要な物性を研究してきた。本フード３D プリンタでは、ペースト状食材（フードインク）を細径のニードルから、指定した座標に指定量押し出し、多層に積層して立体造形を行う。積層造形方式のフード３D プリンタで障害となるのは、食材の持つ多様なレオロジー特性であることが分かった。フードインクを細い内径のニードルから押し出す際は、低粘度ほど有利であることが分かった。これは、押し出し機構に搭載されたモーター出力が一定である状況では、低速出力の大きなモーターが必要になるなど、装置のサイズや価格が増大してしまうためである。一方、押し出し直後には、高粘度化しなければ、短期的にも造形物の形状を保持できない。また、一定時間経過後には、弾性率を増大させなければ、造形物に歯ごたえを付与することができない。具体的には、粘性、および弾性率それぞれにおいて、押し出し前後で数桁高めることが、高速に、また高精度に造形を行うためには必須となる。食品の食感再現、造形幅を拡大するために、ゲル化剤や増粘剤などの添加により、フードインクのレオロジー特性を調整することである程度の造形精度向上を達成することが可能であった。より詳細な検討として、レオメーターを用いた基礎物性の測定を各フードインクに対して実施し、またシリンジポンプでフードインクを押し出すプロセスを再現することで、押し出し時の荷重を経時変化として測定可能な装置を開発した(Fig.1)。これらのフードインクの、レオロジー特性評価により、フードインクに求められる特性について、検討を行った。また、レオロジー特性に合わせて、押し出し量を制御することで、フードインクを設計通りの位置で押し出す、つまりは造形精度を向上させることが可能と考えられた。

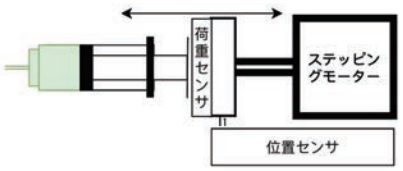


Fig.1 Schematic diagram of load measurement system customized for the evaluation of extrusion of food ink in the food 3D printer.

Three-D printers are attracting attentions, since the ability to place the material onto the specific coordinate as designed. For the establishment of food 3D printing system, the food printer should adopt the wide range of rheological properties, especially to build food object in high resolution. Rheological properties were measured in a series of different ways, including commercial rheometer and the instruments we built, for carbohydrate, protein, and fat-based ink.

food 3D printing, food ink, rheology

発表責任者：武政誠（takemasa@mail.dendai.ac.jp）

講演番号：2D07-09
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 13:30～ ミーティングルーム D

モデル舌で圧縮したやわらかいジェランガムゲルの変形解析

Deformation analysis of soft gellan gum gels compressed with artificial tongues

○神山 かおる[1]、石原 清香[2]、中馬 誠[2]、船見 孝博[2]（[1]農研機構食品研究部門、[2]三栄源エフ・エフ・アイ）
○Kaoru KOHYAMA[1], Sayaka ISHIHARA[2], Makoto NAKAUMA[2], Takahiro FUNAMI[2]（[1]Food Research Institute. NARO, [2]San-Ei Gen F.F.I.）

【目的】少子高齢化が進行する中、介護食品の需要は急上昇しているところである。農水省が取り組む新しい介護食品（スマイルケア食）の区分にある「舌でつぶせる」食品の評価のために、人間の舌に近い力学特性をもつ、透明なソフトマターで作製したモデル舌を用いた圧縮試験法を提案した[1–3]。本法により、舌でつぶせる食品の力学特性を明らかにしてきたが、ここでは食品試料の変形について解析したので報告する。

【方法】一般の圧縮試験における破壊荷重と破壊歪を調節したジェランガムゲル（直径 20 mm、高さ 10 mm の円柱状）を、透明なモデル舌（エクシール社人肌のゲル透明タイプ、50 ×50 ×10 mm）の上に置いて、室温 20℃において、テクスチャーアナライザーの平板プローブで、45 N の荷重を検出するまで等速（10 mm/s）圧縮した。このとき側方からビデオを撮影し、圧縮中の食品ゲルとモデル舌の変形を観察した。

【結果】モデル舌の弾性率がジェランガムゲルより低い場合でも、ゲルが破壊されない場合が観察された。やわらかいモデル舌に食品ゲルが包み込まれ、変形が阻害され破壊されずにモデル舌表面が平板に当たり 45 N に達していた。かたいモデル舌では、圧縮方向の変形が小さいうちに破壊された。やわらかい材料で圧縮したときの変形度合が、舌でつぶせる食品か否かに影響することが示唆された。

【文献】1) Kohyama K. *et al.* (2021) Food Hydrocolloids 112:106283. 2) Kohyama K. (2020) J. Texture Studies 51(4):612-621. 3) Kohyama K. *et al.* (2021) Foods 8(6):182.

Fracture of soft foods by compression with the tongue was modelled using gellan gum gels and artificial tongues. A gellan gum gel (φ20 × 10 mm) with controlled fracture load and deformation was placed on a transparent artificial tongue (50 × 50 × 10 mm) made using urethane transparent gel. During compression test using a texture analyzer at 10 mm/s, deformations of the food gel and artificial tongue were observed from the side using a video camera. More movement was required for gel fracture with softer artificial tongue. The range of tongue-crushable foods can be estimated from the ratio of deformation of food gels compressed with an artificial tongue with appropriate stiffness.

gel, fracture, soft machine

発表責任者：神山かおる（kaoruk@affrc.go.jp）

講演番号：2D07-10
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 13:30～ ミーティングルーム D

グルコノデルタラクトン存在下でのカゼインナトリウム・オボアルブミン混合タンパク質ゲルのゲル化特性とそのネットワーク構造

Characterization of the gelation and resulting network of a mixed-protein gel derived from sodium caseinate and ovalbumin in the presence of glucono-delta-lactone

○太田 尚子[1]、下ノ村 直哉[1]、星 宥伽[1]、レオマック マチュー[2]、堀 孝一[3]、太田 啓之[3]（[1]日本大学短期大学部、[2]リヨン大学、[3]東京工業大学生命理工学院）
○Naoko Yuno-Ohta[1], Naoya Shimonomura[1], Yuuka Hoshi[1], Mathieu Leocmach[2], Koichi Hori[3], Hiroyuki Ohta[3] ([1]Junior College at Mishima, Nihon University,, [2]University of Lyon, [3]School of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology)

私たちはこれまで、熱安定性の異なる混合タンパク質を出発材料としてそのゲル化現象の解析、更にグリセロール等の可塑剤をコントロールしたフィルム状素材の創出とその物性評価を行ってきた。

そこで、今回は混合タンパク質ゲル中での個々のタンパク質のゲル形成への寄与を物性と微細構造の両面から明らかにすることを目的とした。用いたタンパク質には熱凝固性タンパク質として、卵白アルブミン（OVA）を、また、熱に対して高い安定性を有する市販カゼインナトリウム（SC）を用い、ゲル化条件は、常温下でのグルコノ–デルタ–ラクトン（GDL）添加による酸性化法を用いた。その結果、本法による混合タンパク質ゲルでは、OVAの割合が高くなるにつれて相転移開始は早まるもののゲル強度は低下すること、混合ゲル中ではSCがゲルネットワーク骨格を形成するなど混合タンパク質ゲルの先導的な役割を果たしていることが明らかになった。レオロジー測定に加え、タンパク質毎に異なる蛍光剤でラベル化したCLSM観察などの手法を併用することが混合タンパク質ゲルの実態を詳細に把握する有用な手法であることが示唆された。

We investigated mixed-protein gels made from sodium caseinate and ovalbumin at different ratios with use of the acidification agent glucono-delta-lactone (GDL) using rheological measurement, ultrasound spectroscopy, scanning electron microscopy (SEM) and Confocal laser scanning microscopy (CLSM). Dynamic viscoelastic measurements revealed that increasing the ovalbumin content decreased the mechanical properties of the gel but accelerated onset time of the phase transition. CLSM along with scanning electron microscopy revealed that although uniform mixing of sodium caseinate and ovalbumin was observed, sodium caseinate is likely to mainly lead formation of the gel network.

mixed protein gel, confocal laser scanning microscopy, rheological property

発表責任者：太田尚子（NaokoOHTA@aol.com）

講演番号：2D07-11
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 13:30～ ミーティングルーム D

ラボ SAXS 装置による凝乳過程におけるコロイド状リン酸カルシウム（CCP）の時間変化の定点観察
Time evolution of colloidal calcium phosphate during coagulation of milk by laboratory SAXS
○大沼 正人[1]、那須田 祐子[1]、阿部 勇魚[1]、河野 剛[2]、山住 弘[2]（[1]北大工、[2]雪印メグミルク（株）ミルクサイエンス研究所）
○ Masato Ohnuma[1], Yuko Nasuda[1], Isana Abe[1], Tsuyoshi Kawano[2], Hiroshi Yamazumi[2] ([1]Hokkaido Univ., [2]MEGMILK SNOW BRND)

乳の主要な微細構造はサイズの大きい順に、脂肪球（直径 D=数μm）、カゼインミセル（D=100～200nm）、そしてミセルの内部構造としてコロイド状リン酸カルシウム（CCP：D=数 nm）の存在が知られている。ヨーグルトやチーズにおいてはミセルの解離や上述のナノ構造の分散状態の変化が生じる。この分散状態の変化過程は酸凝固反応とレンネット凝固反応では大きく異なることは知られているものの、ナノスケールの変化を実際に観測した例は皆無である。本研究ではその違いの概要を把握する目的で、還元脱脂乳にグルコノ－δ－ラクトン（GDL）、乳酸菌、レンネット、これらの複合添加などによる凝乳過程を透過力の強い Mo-Kα線を用いた高エネルギーラボ X 線小角散乱（SAXS）装置を用いた長時間の連続定点観測を行った。高エネルギーラボ SAXS はその観測 q 領域（$q=4\pi\sin\theta/\lambda$, λ：測定 X 線の波長）から直径数 nm の CCP の観測に適している。また、水を含んだ状態の観測が可能であるため、半日から 1 日程度の長時間にわたって、凝乳過程における CCP 構造の変化を連続的に追跡することが可能である。以上の特長を活用して、酸凝固、レンネット凝固におけるナノ構造の影響、また、殺菌温度による違いについて、検討を行った結果について報告する。

Milk consists of fat globules, Casein micelles and inner structure of the micelles such as colloidal calcium phosphate (CCP). Although it is known that gelation process between rennet-induced and acidification is completely different, the number of reports about change of nanostructure during coagulation is rare due to the difficulty to observe them by non-destructive method. Since laboratory small-angle scattering with high energy X-ray (Mo-Kα line) has high penetration to the cell and sample with water, we can measure about 2 mm thick aqueous gel continuously. Since measured q-range ($q=4\pi\sin\theta/\lambda$, λ: X-ray wave length) is fitted to the size of (CCP), we can observe change of CCP distribution during coagulation of the milk with rennet induced and/or acidification. The effect of heat treatment of milk on the change of CCP is also discussed in this talk.

colloidal calcium phosphate, laboratory small-angle scattering, slow operand measurements

発表責任者：大沼正人（ohnuma.masato@eng.hokudai.ac.jp）

講演番号：2D07-12
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 13:30～ ミーティングルーム D

新規ガス分析装置(IMS)を用いたヨーグルト発酵過程のモニタリング

Monitoring the yogurt fermentation process using novel Ion Mobility Spectrometry (IMS) gas analyzer

○松尾 俊輔[1]、鴻丸 翔平[1]、種田 明子[2]、岩松 正[1]、根岸 晴夫[2] ([1]シャープ株式会社、[2]中部大学応用生物)
○Shunsuke Matsuo[1], Shohei Komaru[1], Akiko Taneda[2], Tadashi Iwamatsu[1], Haruo Negishi[2] ([1]Sharp Corporation, [2]College of Bioscience and Biotechnology, Chubu University)

ヨーグルトの製造では発酵管理が極めて重要で製品の品質を左右する。通常、発酵過程は、ヨーグルトミックスの pH や酸度滴定による乳酸等の測定によってモニタリングされているが、測定に熟練と時間を要することや、接触サンプリングによるコンタミネーションなどのリスクもある。本研究では、SHARP（株）が新規に開発したイオンモビリティースペクトロメトリー（IMS）について、ヨーグルトのヘッドスペースガスを非接触でリアルタイムに測定できること、および発酵モニタリング手段としての有効性を検討した。IMS ガス分析装置は、ガスを大気中でイオン化し、その移動度を測定する原理で、出力スペクトルから成分分析も可能である。ヘッドスペースの揮発成分を IMS 分析した結果、出力スペクトルの主ピークはヨーグルトの発酵に伴って増加し、酸度や pH の変化と強く相関することが確認された。また、様々な標準物質の IMS 分析より、その主ピークは乳酸や酢酸等の有機酸が混在していることが推定された。さらに、発酵乳製品の菌種についても IMS スペクトルで類推できる可能性が示唆された。

Fermentation control is extremely important in yogurt production and affects the quality of the product. Generally, the yogurt fermentation process is monitored by measuring lactic acid in the yogurt mix by pH and acidity titration, but the problems are that the measurement requires high expertise and time, and the contact sampling causes contamination. The purpose of this study is to examine that novel Ion Mobility Spectrometry (IMS) developed by SHARP Corporation can measure the headspace gas of yogurt in real time without contact and is effective as a fermentation monitoring device. The principle of IMS gas analyzer is to ionize gas in the atmosphere and measure the ion mobility, and component analysis is also possible from the output spectrum. The results of IMS analysis of the volatile components in the headspace showed that the main peak of the output spectrum increased with the fermentation of yogurt and strongly correlated with changes in acidity and pH. In addition, IMS analysis of various standard substances revealed that the main peak was a mixture of organic acids such as lactic acid and acetic acid. Furthermore, it was suggested that the bacterial strains in fermented dairy products could be inferred from the IMS spectrum.

ion mobility spectrometry, fermented dairy products, volatile component

発表責任者：松尾　俊輔（matsuo.shunsuke@sharp.co.jp）

講演番号：2D07-13
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 13:30～ ミーティングルーム D

低苦味価ビールにおけるグラム陽性芽胞菌の増殖性評価

Study of the growth of gram-positive, endospore-forming bacteria in low-bitterness beer products

○町田 賢司、蛸井 潔、金子 剛（サッポロビール株式会社）
○Satoshi MACHIDA, Kiyoshi TAKOI, Takeshi KANEKO (SAPPORO BREWERIES LTD.)

【背景・目的（Introduction, Objectives）】

近年、消費者の嗜好に合わせて様々なタイプのビールテイスト飲料が開発されており、中には苦味を抑えた製品もある。ビールに苦味を付与する成分はホップ由来のイソα酸等だが、この物質はグラム陽性菌に対する抗菌活性も有することが知られている。したがって、苦味を抑えたビールを開発するためにビール中のイソα酸等の含量を少なくすれば、イソα酸等により静菌されていたグラム陽性菌が増殖しやすくなるという課題が生じる。グラム陽性菌の中でも芽胞形成細菌は低温殺菌での制御が困難であることから、製品中での増殖性を確認することは微生物の増殖を予防する上で特に重要である。本研究では苦味を抑制したビールにおけるグラム陽性芽胞菌の増殖性を調査した。

Many types of beers with different flavors and aromatic profiles have been developed recently for satisfying the consumer palate. Such types of beers are often produced with low bitterness. The hop-derived iso-α-acids not only contribute to the bitterness of the beers but also impart antimicrobial properties against gram-positive bacteria. Endospore-forming bacteria are strongly sensitive to the hop-derived bitter acids and therefore do not cause any problems to the normally-hopped beers. However, it is assumed that a beer with low bitterness may get spoiled by such bacteria. In this study, we investigated the growth pattern of gram-positive bacteria in a test-brewed low-bitterness beer sample to confirm the microbiological stability of the low-bitterness beer products.

【方法・結果（Method, Results）】

苦味価（BU）の低い領域での増殖性が強いグラム陽性芽胞菌を選抜するために、無ホップのビールテイスト飲料のサンプルに対して、醸造環境に存在し得る、生育下限 pH の低いグラム陽性芽胞菌を接種し、30℃嫌気条件下で増殖性を確認した。その結果、*Sporolactobacillus* 属菌の増殖性が強いことが明らかとなった。次に、同サンプルと通常のビールを混合して BU と pH が異なる条件で試験を行なった結果、*Sporolactobacillus* 属菌を静菌できる BU と pH の範囲を明らかにできた。

Gram-positive endospore-forming bacteria isolated from a brewing environment were inoculated in an unhopped beer sample to select some strains possessing good growing capacity under the low-bitterness condition. After incubation under anaerobic conditions at 30°C, some of the vegetative cells of the *Sporolactobacillus* spp. showed better growth. In addition, we discovered that a specific pH and a bitterness-unit (BU) range was able to inhibit the *Sporolactobacillus* spp. from growing.

low-bitterness beer, spoilage bacteria, *Sporolactobacillus* spp.

発表責任者：町田　賢司（satoshi.machida@sapporobeer.co.jp）

講演番号：2E01-01
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 09:00～ ミーティングルーム E

自己免疫疾患シェーグレン症候群の涙液分泌機能低下に及ぼすブルーベリー葉エキスの作用

Preventive effects of blueberry leaf extract on lacrimal secretion in incurable disease Sjögren's syndrome-model mice

○浦田 果林[1]、前田 咲[1]、小川 健二郎[2]、大野 雄太[4]、佐藤 慶太郎[5]、山﨑 正夫[1]、西山 和夫[1]、後藤 陽[3]、中山 貴之[3]（[1]宮崎大農、[2]宮崎大テニュアトラック、[3]ビオラボ、[4]朝日大歯、[5]明海大歯）
○Karin URATA[1], Saki MAEDA[1], Kenjirou OGAWA[2], Yuta OHNO[4], Keitaro SATOH[5], Masao YAMASAKI[1], Kazuo NISHIYAMA[1], Yo GOTO[3], Takayuki NAKAYAMA[3] ([1]Univ. of Miyazaki, [2]Tenure Track, Univ. of Miyazaki, [3]Biolabo Co., Ltd., [4]Asahi Univ., [5]Meikai Univ.)

シェーグレン症候群（Sjögren's syndrome: SjS）は、涙腺や唾液腺にリンパ球が浸潤し、慢性炎症を引き起こすことで外分泌機能が低下する。これにより、ドライアイやドライマウスなどのドライ症状を呈する自己免疫疾患であり、本邦では難病に指定されている。SjS には原因療法が存在しない上、ドライ症状を発症すると QOL が著しく低下するため、予防法の確立が求められている。健康食品は日常的に継続して摂取が可能で、その予防効果が期待できる。しかし、SjS による涙液分泌に影響を及ぼす食品素材は未だ報告されていない。宮崎県では、ポリフェノールを高含有するブルーベリー葉熱水抽出物（blueberry leaf extract: BLEx）の健康食品開発に取り組んできた。本研究では、SjS モデルとして知られる non-obese diabetic（NOD）マウスを用いて、SjS の涙液分泌機能低下に及ぼす BLEx の作用を評価した。雄性 NOD マウスに通常の AIM-93G 食、または BLEx 1%混餌 AIM-93G 食を 2 週間摂取させた。副交感神経作動薬にて分泌される涙液分泌量を測定した結果、BLEx 摂取マウスで涙液分泌量が増加した。そこで、BLEx 摂取による涙液分泌量増加の作用機序を明らかにするため、NOD マウスより涙腺組織を採取し、組織切片による浸潤評価、ELISA 法、ウェスタンブロット法、PCR 法により、炎症との関与を調べた。本講演では、上記の研究成果について紹介する。

Sjögren's syndrome (SjS) is an incurable disease which causes dry eye and dry mouth symptoms. The infiltration of lymphocytes into the lacrimal and salivary glands causes chronic inflammation and reduces exocrine secretion. Prevention of SjS is awaited and functional foods are expected to be putative materials. However, the food ingredients that can improve lacrimal secretion on SjS have not yet been reported. Then, we investigated the effect of blueberry leaf water extract (Blueberry leaf extract: BLEx) on SjS phenotypic non-obese diabetic (NOD) mice. BLEx is rich in polyphenol and has been developed as novel health food material in Miyazaki. Male NOD mice were fed diets containing 1% BLEx or normal AIM-93G diet for 2 weeks. As a result, BLEx increased lacrimal secretion volume under administration of parasympathomimetic. Now, we are evaluating the infiltration on histological analysis, ELISA assay, western blotting, and RT-PCR assay to investigate its involvement with anti-inflammation of BLEx in lacrimal gland on NOD mice. In this presentation, I would like to introduce our result.

Sjogren syndrome, lacrimal gland, blueberry leaf

発表責任者：小川健二郎（ogawa.kenjirou.u2@cc.miyazaki-u.ac.jp）

講演番号：2E01-02
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 09:00～ ミーティングルーム E

シソ葉香気成分ペリルアルデヒドは樹状細胞における炎症性サイトカインの発現を抑制し、皮膚炎を改善する

Perillaldehyde, an aroma component of *Perilla frutescens* leaves, inhibits pro-inflammatory cytokine expression in dendritic cells and improves dermatitis

○岡田 光、八代 拓也、西山 千春（東理大）
○Hikaru OKADA, Takuya YASHIRO, Chiharu NISHIYAMA (Tokyo Univ. Sci.)

シソの葉は料理に彩りや香りを付与し、その抗菌活性から保存食にも利用される和食に特徴的な食材である。主たる香気成分であるモノテルペン化合物ペリルアルデヒド（PA）は、近年、炎症性腸疾患やがんに対する有効性が報告されている。我々は PA が樹状細胞（DC）や CD4T 細胞の活性化を抑制することを昨年度本大会で発表し、今回はさらに、DC 活性化抑制における PA の作用点を解析し、免疫疾患モデルを用いて PA の生理活性を検証した。
マウス骨髄細胞由来培養 DC を PA で前処理したのち PolyI:C（TLR3 リガンド）、LPS（TLR4）、R848（TLR7/8）、CpG-ODN（TLR9）で刺激し、炎症性サイトカイン（*Il6*, *Il23a*, *Il12b*, *Tnf*）の発現レベルを測定した。その結果、PA はこれらの TLR リガンド刺激による炎症性サイトカインの発現上昇を軒並み低下させることが判明し、PA が TLR 下流のシグナル伝達機構の共通部分を阻害することで樹状細胞活性化を抑制することを示唆している。次に、生体における免疫抑制作用を検証するため、TLR7 リガンドであるイミキモドをマウスの耳に連続塗布することで誘導される乾癬モデルを用いて解析した。その結果、PA の経口投与によって耳の腫れが抑制され、炎症性サイトカインの発現レベルも低下傾向を示した。以上のことから、PA は DC における炎症性サイトカインの発現を抑制し、イミキモド誘導性乾癬を抑制することが示唆された。

The *Perilla frutescens* leaf is a unique Japanese foodstuff, with vivid green color, strong flavor, and anti-septic function. Perillaldehyde (PA), which is a major aroma compound belonging to monoterpenes, is reported to improve inflammatory bowel disease and cancer. Here, we investigated how PA suppresses DC activation and whether PA improves an immune disease, as a follow-up report of our previous presentation in the latest JSBBA. We evaluated the effect of PA on the cytokine production of DCs stimulated with TLR ligands, such as PolyI:C (TLR3 ligand), LPS (TLR4), R848 (TLR7/8), or CpG-ODN (TLR9). As a result, PA suppressed TLR ligands-induced up-regulation of pro-inflammatory cytokines, suggesting that PA represses DC activation by inhibiting common part of the downstream of TLR signals. Next, to verify the effects of PA *in vivo*, we used psoriasis mice model that is induced by consecutively applying TLR7 ligand, imiquimod, onto the ear. Oral administration of PA inhibited the ear swelling and tended to reduce the expression levels of pro-inflammatory cytokines. Taken together, PA inhibits pro-inflammatory cytokine expression in DCs and imiquimod-induced psoriasis.

Perillaldehyde, Dendritic cells, Psoriasis

講演番号：2E01-03
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 09:00～ ミーティングルーム E

Lactobacillus plantarum LOC1 による IL-12 発現誘導の作用機序の解析

Analysis of the mechanism of IL-12 expression induction by *Lactobacillus plantarum* LOC1

○日浦 月穂[1]、鈴木 政彦[2]、本田 瑞希[1]、辻川 勇治[2]、坂根 巌[2]、薩 秀夫[3]([1]前橋工大院工、[2](株)伊藤園・中央研究所、[3]前橋工大工)
○Tsukiho HIURA[1], Masahiko SUZUKI[2], Mizuki HONDA[1], Yuji TSUJIKAWA[2], Iwao SAKANE[2], Hideo SATSU[3] ([1]Grad. Sch. of Eng., Maebashi Inst. Technol., [2]Central Research Institute, ITO EN Ltd., [3]Maebashi Inst. Technol.)

【目的】ある種の乳酸菌はマクロファージや樹状細胞に曝されるとインターロイキン 12(IL-12)の分泌を亢進し、さらにナイーブ CD4T 細胞の分化を誘導、インターフェロンγ産生を介してナチュラルキラー細胞を活性化することで生体防御能を高めることが報告されている。そこで本研究では、IL-12 産生を亢進する乳酸菌の探索及び作用機構の解析をおこなうこととした。
【方法・結果】マクロファージモデル J774.1 細胞を用いて、IL-12 分泌能を有する乳酸菌を ELISA 法によりスクリーニングした結果、*Lactobacillus plantarum* LOC1 株が最も顕著に IL-12 分泌を亢進した。そこで、LOC1 株の IL-12 発現亢進に関与する菌体成分を同定するためにいくつかの酵素で処理したところ、RNase 処理によって IL-12 発現が有意に抑制され、RNA の関与が示唆された。さらに、RNA 干渉法を用いて細胞内シグナル経路を検討したところ、TLR8 を含めたいくつかのシグナル分子の関与が示唆された。

【 Objectives 】 Probiotics such as lactic acid bacteria (LAB) stimulates dendritic cells or macrophages to induce the secretion of interleukin-12 (IL-12), leading to the production of interferon γ (IFN-γ) from CD4 T cells. Further, IL-12 and IFN-γ enhance the innate immune system of the host by activation of natural killer (NK) cells. Thus, the purpose of this study was to search for the probiotics that induce IL-12 production and to clarify the regulatory mechanism of LAB-induced IL-12 expression in immune cells.
【Methods and Results】Screening of lactic acid bacteria that enhance IL-12 secretion by ELISA using macrophage-like J774.1 cells showed that *Lactobacillus plantarum* LOC1 strain most enhanced IL-12 secretion. Then, LOC1 was treated with various enzymes to analyze the bacterial cell components involved in IL-12 induction by LOC1. RNase treatment significantly suppressed the increase in IL-12 expression by LOC1, suggesting that RNA was an inducer of IL-12 production from J774.1 cells. Furthermore, RNAi which was used to recognize the intracellular signal pathway showed the involvement of several signal molecules including TLR8.

IL-12, Lactic acid bacteria, Macrophage

発表責任者：薩秀夫（satsu@maebashi-it.ac.jp）

講演番号：2E01-04
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 09:00～ ミーティングルーム E

乳酸菌 RNA が CD4+ T 細胞の増殖および IL-2 産生に与える影響

Effect of lactic acid bacteria RNA on proliferation and IL-2 production of CD4+ T cells

○谷田貝 円[1]、青木 玲二[2]、大久保 愛実[3]、正田 紗弓[3]、宮本 真緒[3]、御林 碧波[3]、平井 智美[3]、川澄 俊之[1,3]、青木 綾子[3] ([1]日本女子大院・家政、[2]農研機構・畜産研、[3]日本女子大・食物)
○ Madoka Yatagai[1], Reiji Aoki[2], Megumi Okubo[3], Sayumi Shoda[3], Mao Miyamoto[3], Aoba Mihayashi[3], Satomi Hirai[3], Toshiyuki Kawasumi[1,3], Ayako Aoki[3] ([1]Grad. Japan Women's Univ., [2]NARO, [3]Japan Women's Univ.)

【目的】特定の乳酸菌 RNA に CD4+ T 細胞の増殖抑制活性があることがわかっている。しかし、乳酸菌 RNA による CD4+ T 細胞の増殖抑制活性が菌株特異的なのかどうかについては明らかにされていない。そこで本研究では、漬物由来乳酸菌 60 菌株を用い、これらの乳酸菌 RNA が CD4+T 細胞の増殖および interleukin (IL)-2 産生に与える影響を調べた。【方法】乳酸菌から RNA を調製し、Balb/c マウス脾臓由来 CD4+ T 細胞に添加し、anti-CD3/anti-CD28 抗体で刺激して培養した。48 時間後の培養上清中 IL-2 量を ELISA により測定した。また、96 時間後の増殖応答を、水溶性テトラゾリウム塩 WST-8 を用いた吸光測定により評価した。【結果】1 菌株を除いて、全ての菌株で増殖抑制効果を認めた。一方、IL-2 量に対しては菌株によって作用が異なることがわかった。このため、乳酸菌 RNA による CD4+ T 細胞の増殖と IL-2 産生に対する作用は異なる機構により制御されている可能性が示唆された。また、これらの抑制活性に関しては、菌種特異性は認められず、菌株特異的であることが明らかになった。

Purpose: RNA from certain strain of lactic acid bacteria (LAB) have been found to inhibit CD4+ T cell proliferation. However, it is not clear whether the inhibitory effect of RNA is strain-specific or not. In this study, we examined the effects of RNA from 60 LAB strains on the proliferation and the IL-2 production of murine CD4+ T cells. Method: CD4+ T cells were prepared from Balb/c mouse spleen and they were cultured with anti-CD3/anti-CD28 antibody stimulation. RNA prepared from 60 LAB strains were added to the culture. After 48 hours, culture supernatants were collected and the amounts of IL-2 were measured by ELISA. In addition, the proliferation of CD4+ T cells after 96 hours was evaluated by WST-8 assay. Results: The inhibitory effect of RNA on CD4+ T proliferation was observed for all strains except one. On the other hand, we found that the effects of LAB RNA on IL-2 were differed between strains. These suggest that the effects of LAB RNA on CD4+ T cell proliferation and IL-2 production may be regulated by different mechanisms and that these inhibitory activities were strain-specific, not species-specific.

CD4+ T cell, lactic acid bacteria, RNA

講演番号：2E01-05
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 09:00～ ミーティングルーム E

ブルーベリー素材が自己免疫疾患シェーグレン症候群モデル動物の唾液分泌量に及ぼす影響

Effects of blueberry material on salivary secretion in Sjögren's syndrome-model mice

○小川 健二郎[1]、前田 咲[2]、浦田 果林[2]、佐藤 慶太郎[3]、大野 雄太[4]、山﨑 正夫[2]、西山 和夫[2]（[1]宮崎大テニュアトラック、[2]宮崎大農、[3]明海大歯、[4]朝日大歯）
○Kenjirou OGAWA[1], Saki MAEDA[2], Karin URATA[2], Keitaro SATOH[3], Yuta OHNO[4], Masao YAMASAKI[2], Kazuo NISHIYAMA[2] ([1]Tenure Track, Univ. of Miyazaki, [2]Univ. of Miyazaki, [3]Meikai Univ., [4]Asahi Univ.)

シェーグレン症候群（Sjögren's syndrome: SjS）は女性優位に発症する代表的な自己免疫疾患である。SjS モデル動物の一つである NOD マウスは、雌性において 10 週齢過ぎから唾液腺への炎症性細胞浸潤が観察され、唾液分泌量低下の病態を呈する一方、雄性においては唾液腺への病態誘導は弱い。我々は、SjS 唾液腺病態に雌雄差が生じる機序として、性ホルモンの関与を考えた。食品に含まれるポリフェノール類は、性ホルモン様作用やホルモン受容体に影響することが報告されている。そこで、我々は雄性 NOD マウスにおいて、ポリフェノールを高含有するブルーベリー素材が唾液分泌機能に及ぼす影響を検討した。マウスに通常食、またはブルーベリー素材抽出物混餌食を 2 週間摂取させた後、副交感神経作動薬にて分泌される唾液分泌量を測定した。結果、ブルーベリー抽出物摂取により唾液分泌量が増加した。その作用メカニズムを明らかにするため、マウスより唾液腺を採取し、組織標本による評価、ELISA 法、Western Blot 法、RT-PCR 法を行い、炎症や分泌関連タンパク質、性ホルモンとの関与を調べた。本講演ではその研究成果を紹介する。

Sjögren's syndrome (SjS) is a typical autoimmune disease which is developed most commonly in women. Non-obese diabetic (NOD) mice, the SjS-model animals, have an inflammation in female salivary glands, subsequently reveals a decrease of salivary secretion after 10 weeks old. However, the pathological features in salivary glands in male NOD mice are weaker than those observed in female mice. We speculated that sex hormones might be involved in these gender differences in the SjS pathology. Polyphenols contained in foods are known to show sex hormone-like effect and/or affect hormone receptors. Thus, we investigated the effect of blueberry materials (BBMs) containing rich polyphenols on salivary secretion in male NOD mice. As a result, the administration of BBM extracts increased the amount of saliva induced by parasympathomimetic. Now, we are evaluating the effects of extracts on salivary glands by histological analysis, ELISA assays, western blotting, and RT-PCR to investigate the involvement of inflammation, secretion-related proteins, and sex hormones in male NOD mice. We would like to introduce our results.

Sjogren syndrome, salivary gland, blueberry

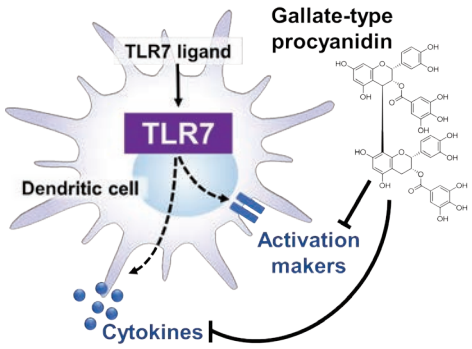
発表責任者：小川健二郎（ogawa.kenjirou.u2@cc.miyazaki-u.ac.jp）

講演番号：2E01-06
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 09:00～ ミーティングルーム E

樹状細胞の TLR7 シグナルに対するガレート型プロシアニジンの影響

Regulation of TLR7 signaling by Gallate-type procyanidin in dendritic cells

○澤 陶有子、遠藤 勝紀、田中 佑奈、真壁 秀文、田中 沙智（信州大農）
○Toko SAWA, Katsunori ENDO, Yuna TANAKA, Hidefumi MAKABE, Sachi TANAKA (Shinshu Univ.)



Toll-like-receptor 7 （TLR7）を介した過剰なサイトカインの産生は、慢性炎症性疾患の原因の一つである。近年、TLR7 シグナルの調節効果を有する食品由来成分の探索・同定およびその応用が期待されている。当研究室では、食品由来ポリフェノールの一種であるガレート型プロシアニジンの抗炎症効果を明らかにしてきた。本研究では、TLR7 刺激により活性化した樹状細胞に対するガレート型プロシアニジンの抑制効果を検証した。まず、TLR7 リガンドで刺激したマウス脾臓細胞を用いて解析したところ、TLR7 刺激によって増加する炎症性サイトカインの産生がガレート型プロシアニジンの添加により抑制された。また、脾臓細胞中の樹状細胞における活性化マーカーの発現がガレート型プロシアニジンの添加で低下したことから、ガレート型プロシアニジンは樹状細胞に作用することが示唆された。そこで、樹状細胞に対するガレート型プロシアニジンの作用を評価するため、マウス骨髄由来樹状細胞（BMDC）を用いて解析したところ、TLR7 リガンドの刺激で増加する炎症性サイトカインの産生および活性化マーカーの発現はガレート型プロシアニジンの添加で低下した。以上の結果から、ガレート型プロシアニジンは樹状細胞における TLR7 シグナルの過剰な活性化を制御することが明らかになった。

Food-derived components are expected to control excessive cytokine production by TLR7 signaling that causes chronic inflammatory diseases. We previously reported the anti-inflammatory effect of gallate-type procyanidin which is one of food derived polyphenols. In the present study, we examined the effects of gallate-type procyanidin on the activation of dendritic cells (DCs) by TLR7 ligand stimulation. We found that gallate-type procyanidin significantly suppressed the production of inflammatory cytokines from spleen cells stimulated with TLR7 ligand. In addition, the expression of activation markers on DCs from spleen cells was reduced by gallate-type procyanidin, suggesting that gallate-type procyanidin would specifically regulate the activation of DCs. In order to assess the effects of gallate-type procyanidin on DCs, bone marrow-derived dendritic cells (BMDCs) were induced and treated with gallate-type procyanidin under stimulation of TLR7 ligand. As a result, gallate-type procyanidin significantly decreased the production of inflammatory cytokines and the expression of activation markers in BMDCs. These results suggest that gallate-type procyanidin might have beneficial effects to control TLR7-mediated immune responses in chronic inflammatory diseases.

Gallate-type procyanidin, dendritic cell, TLR7

発表責任者：澤 陶有子（17a2016k@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：2E01-07
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 09:00～ ミーティングルーム E

マウスにおけるαG ナリンジンの抗肥満作用

Anti-obesity effect of αG naringin in mice

○松本 敦子[1]、長田 恭一[2]、橋爪 雄志[3]、タンジャ マハマドゥ[3]（[1]明治大院農、[2]明治大農、[3]東洋精糖（株））
○Atsuko MATSUMOTO[1], Kyoichi OSADA[2], Yuji HASHIZUME[3], Tandia MAHAMADOU[3]（[1]Meiji Graduate School, [2]Meiji Univ., [3]Toyo sugar Refinig Co.,Ltd.）

グレープフルーツ等の柑橘類に多く含まれるフラボノイドであるナリンジンは、コレステロール低下作用等の脂質代謝改善作用、体温上昇や食欲抑制等の抗肥満作用を示すことが知られている。しかし、ナリンジンは疎水性であるため生体内への吸収率が低い。αG ナリンジンは、ナリンジンを酵素処理しグルコースを転移させて水溶性を高めた素材である。以前の研究で、αG ナリンジンはナリンジンよりも生体内への吸収性が速く体外に代謝産物が排出されにくいことを明らかにした。そこで、本研究では、αG ナリンジンの抗肥満作用の検証とその作用機序を解明することを目的とした。

3 週齢の C57BL/6J 雄性マウスを予備飼育し、AIN76 純化基準飼料を与えた NC 群、基準食に 15%のラードを加えた飼料を与えた PC 群、15%のラード及び 0.2%の αG ナリンジンを加えた飼料を与えた LA 群、15%のラード及び 1.0%の αG ナリンジンを加えた飼料を与えた HA 群の 4 群に分け、54 日間飼育した。12 時間の絶食後に解剖し、血漿及び肝臓の脂質代謝関連項目を測定した。

αG ナリンジンの摂食により、最終体重、体重増加量、最終腹囲、皮下脂肪及び総白色脂肪重量が有意に減少した。血漿の脂質代謝パラメータについては、総コレステロールレベル及び HDL コレステロールレベルが有意に減少し、動脈硬化指数は減少傾向となった。また、血糖値が有意に減少した。血漿中のアディポサイトカインレベルは、EGF、アディポネクチン及びレプチンのレベルが有意に減少した。さらに、肝臓の脂質代謝パラメータは、トリグリセリドレベルが減少傾向となり、脂肪酸 β 酸化関連遺伝子である CPT1a 及び CPT2 の発現レベルが有意に増加した。

以上より、αG ナリンジンは、肝臓の脂肪酸 β 酸化を促進することにより、抗肥満作用を示すと考えられる。

αG naringin is transglucosylated material of naringin using enzyme to improve water solubility. We found the bioavailability of αG naringin is higher than naringin in previous study. The purpose of this study was to verify the anti-obesity effect of αG naringin and its mechanism. Mice were fed αG naringin for 54 days. Dietary αG naringin significantly reduced weight gain, white adipose weight, plasma cholesterol level, and hepatic triglyceride level. In addition, the mRNA expression levels of enzymes relating fatty acid β-oxidation in liver were significantly increased by dietary αG naringin. Thus, αG naringin may exhibit an anti-obesity effect through promotion of hepatic β-oxidation.

naringin, anti-obesity effect, β-oxidation

講演番号：2E01-08
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 09:00～ ミーティングルーム E

ゲニステインはミトコンドリア標的分子を介して脂質蓄積を制御する
Genistein regulates lipid acculumation by binding of mitochondrial protein

○三谷 塁一、池田 貴弘、渡邉 駿（信大院総合理工(農学)）
○Takakazu MITANI, TAKAHIRO IKEDA, SHUN WATANABE (Div. Food Sci. and Tech., Grad. Sch. of Sci. and Tech., Shinshu Univ.)

【目的】肥満の原因は脂肪細胞内の過度な脂質蓄積にあり、脂肪細胞の肥大化や脂質蓄積を抑制する食品成分は広く研究されている。一方で、食品成分の標的タンパク質や抑制効果の詳細な作用機構など未だ不明な点が多い。本研究では、大豆イソフラボンであるゲニステイン (Gen)の脂肪細胞における標的タンパク質を同定し、標的タンパク質を介した脂質蓄積抑制機構を解明することを目的とした。
【方法と結果】細胞はマウス線維芽細胞株 (3T3-L1)とマウス脂肪組織から単離した脂肪前駆細胞を脂肪細胞へと分化させて解析に用いた。Gen の標的タンパク質を同定するために、Gen 固定化ビーズと脂肪細胞抽出液によるプルダウンアッセイを行った。その結果、Gen の標的タンパク質として ADP/ATP 交換輸送体 2 (ANT2)を同定した。ANT2 はミトコンドリア内膜に局在し、ADP をマトリックスに輸送し、そこで合成された ATP を細胞質に放出する働きを持つ。Gen 添加による脂肪細胞内 ATP 量の変化を解析した結果、Gen の添加は ANT2 のノックダウンと同様に細胞内 ATP 量を減少した。従って、Gen は ANT2 と結合し、その機能を阻害することで細胞内 ATP 量を低下することが示された。続いて、ANT2 の阻害が脂肪前駆細胞に及ぼす影響を ANT2 の siRNA (siANT2)を用いて解析した。siANT2 は細胞生存率に影響を示さなかったが、脂肪細胞への分化は抑制された。siANT2 は脂肪細胞分化の主要転写因子である PPARγ の発現量を転写レベルで減少した。siANT2 は PPARγ の上流に位置する転写因子 C/EBPβ、C/EBPδ の発現量に影響を及ぼさなかったが、C/EBPs の転写活性は siANT2 によって顕著に低下した。さらに、細胞内 ATP 量の低下で活性化する AMPK を阻害すると siANT2 による C/EBP の転写活性の低下は回復した。以上の結果から、Gen は、ANT2 を阻害することで細胞内 ATP 量を減少することで C/EBPs の転写活性化能を低下し、これによって脂肪細胞への分化が抑制されることが明らかとなった。

Plant polyphenols are known to excess suppressing effect of lipid accumulation in adipocyte, but the detailed mechanism remain unclear. To elucidate the molecular mechanism by which isoflavone suppresses lipid accumulation, we identified the target protein of isoflavone in adipocyte. Pulldown assay showed soy isoflavone genistein bound ANT2 protein, and genistein decreased intracellular ATP levels by inhibition of ANT2 function. Genistein and ANT2 knockdown suppressed adipocyte differentiation, and down-regulated transcriptional activity of C/EBPs which act as a regulator on the early stage of adipocyte differentiation. These results indicated that genistein suppressed lipid accumulation in adipocyte by the inhibition of ANT2 function.

Genistein, adipocyte, mitochondria

発表責任者：三谷塁一（mitani@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：2E01-09
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 09:00～ ミーティングルーム E

熊野市特産柑橘『新姫』果皮抽出エキスの抗肥満効果

Anti-obesity effect of Niihime peel extract

○渡辺 章夫[1,5]、米澤 貴之[1]、深尾 弦貴[3]、渡邉 晴奈[2]、中村 太郎[2]、山野 亜紀[4]、照屋 俊明[4]、禹 済泰[2] ([1]中部大・生機研、[2]中部大院・応生、[3]中部大・応生、[4]琉球大院・理工、[5]十文字女子大・食開)

○Akio WATANABE[1,5], Takayuki YONEZAWA[1], Genki FUKAO[3], Haruna WATANABE[2], Taro NAKAMURA[2], Aki YAMANO[4], Toshiaki TERUYA[4], Je-Tae WOO[2] ([1]Research Institute for Biological Functions, Chubu Univ., [2]Graduate School of Bioscience and Biotechnology, Chubu Univ., [3]Department of Biological Chemistry, Chubu Univ., [4]Graduate school of Engineering and Science, Univ. of the Ryukyus., [5]Department of Food Science, Jumonji Univ.)

『新姫』は三重県熊野市で商業的に栽培されている比較的新しい香酸柑橘である。タチバナと温州ミカンの自然交雑種とされ、シークヮーサーのように強い酸味と独特の爽やかな香りを持つ。これまでの研究でシークヮーサーから単離されたノビレチンが細胞や動物において脂質代謝を改善することが報告されている。『新姫』もまたノビレチンを豊富に含むため、シークヮーサーと同様の抗肥満効果が期待されている。そこで本研究では脂肪細胞と高脂肪食誘発性肥満モデルを用いて、『新姫』の果皮残渣エキスの作用の解析を行った。その結果、3T3-L1 由来成熟脂肪細胞において、『新姫』果皮抽出エキスが脂肪分解を促進することを見出した。次に、高脂肪食誘発性肥満モデル動物を用いて、『新姫』果皮抽出エキスの混餌投与の影響を解析した。その結果、『新姫』果皮抽出エキス(1%)配合高脂肪食投与群では高脂肪食のみ投与群と比較して、有意に体重能増加が抑制された。また『新姫』果皮抽出エキス投与群(1%)では血漿中コレステロールも減少していた。これらのことから、『新姫』には抗肥満効果があることが示唆された。『新姫』にはシークヮーサーと同様に脂質代謝の改善に有用な新しい機能性食品素材として期待される。

Niihime, a relatively recent discovered sour Citrus fruit first, is commercially cultivated only in Kumano area of Mie prefecture. It is thought to be an autogenous citrus consisting of a mandarin and Tachibana (*Citrus tachibana*) cross hybridization, possesses a citrus flavor and sour taste like Shiikuwasa (*Citrus depressa*). Previous studies have demonstrated that nobiletin isolated from Shiikuwasa, modulate lipid metabolism in cells and animals. Since Niihime also have rich of nobiletin, it is expected to have anti-obesity effects as same as Shiikuwasa. In this study, we examined the effects of Niihime peel extract on lipid metabolism using 3T3-L1 adipocytes and high-fat diet (HFD)-induced obese mice. In mature 3T3-L1 adipocytes, we found that Niihime peel extract dose-dependently enhanced glycerol release, which is an indicator of lipolysis. In HFD-induced obese mice, the body weight gain of the HFD-supplemented with Niihime peel extract group (1%) was significantly decreased compared with the HFD group. The plasma cholesterol level was also significantly reduced in the HFD-supplemented with Niihime peel extract group (1%) compared with the HFD group. These results suggest that Niihime peel extract induces lipolysis and have anti-obesity effects. Niihime would be useful for the treatment of lipid metabolism disorders as a new functional food sources like Shiikuwasa.

Niihime peel extract, Anti-obesity, Nobiletin

講演番号：2E01-10
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 09:00～ ミーティングルーム E

ガーリック由来香気成分が高脂肪食給餌ラットの脂肪酸合成に及ぼす影響

The effect of diallyl trisulfide on de novo fatty acid synthesis in the rat fed high fat diet.

○阿部 真理奈[1]、渡辺 高大[1]、三浦 徳[2]、増澤（尾﨑）依[3]、細野 崇[1,3]、関 泰一郎[1,2,3]（[1]日大院・生資科・応生科、[2]日大・生資科・総合研究所、[3]日大・生資科・生命化）
○Marina ABE[1], Takahiro WATANABE[1], Atsushi MIURA[2], Yori OZAKI-MASUZAWA[3], Takashi HOSONO[1,3], Taiichiro SEKI[1,2,3] ([1]Nihon Univ. Grad. School, [2]Nihon Univ. General Research Institute, [3]Nihon Univ.)

ガーリック由来香気成分 Diallyl trisulfide (DATS) は抗がん、抗血栓、抗肥満作用など様々な薬理作用を示す。本研究では DATS の抗肥満作用メカニズムの一端を解明する目的で DATS が肝臓の脂質合成に及ぼす影響を解析した。SD ラット（6 週齢、オス）に 60 kcal% Fat の高脂肪食を与え、DATS（500 μmol/kg b.w.）もしくは Vehicle を 2 日に 1 度 8 週間経口投与した。経時的に血漿、肝臓、精巣上体白色脂肪組織（epiWAT）を回収し、脂質や脂質代謝関連遺伝子の発現について qPCR により解析した。血漿中トリアシルグリセロール（TG）濃度は市販のキットを用いて測定した。また、体内の脂肪酸の *de novo* 合成を測定する目的で、予め重水を腹腔内投与したラットに上記の条件で DATS と Vehicle を経口投与した。試験開始 10 日後に解剖し、血漿や各種臓器における脂肪酸を GC/MS により測定した。

DATS 群は Vehicle 群と比較して摂餌量に影響を与えず、体重増加を有意に抑制した。また、試験開始 8 週間後の白色脂肪組織重量や血漿中 TG 濃度は Vehicle 群と比較して DATS 群で有意に低下した。さらに肝臓と epiWAT における脂質合成遺伝子 Scd1, Fasn の発現や実験期間中に *de novo* 合成された脂肪酸量は、Vehicle 群と比較して DATS 群で有意に低下していた。DATS 投与は脂質合成遺伝子の発現を抑制し、肝臓における *de novo* lipogenesis を阻害する可能性が明らかとなった。

Diallyl trisulfide (DATS) is a flavor compound derived from garlic. We reported the anti-cancer, anti-thrombotic and anti-obesity effects of DATS. In this study, we explored the effect of DATS on hepatic lipid synthesis to elucidate a part of the anti-obesity mechanism of DATS. SD rats (6 weeks old, male) were fed a high-fat diet of 60 kcal% fat and DATS (500 μmol/kg b.w.) or Vehicle was orally administered once every two days for 8 weeks. Triacylglycerol (TG) in plasma, liver and white adipose tissue (WAT) was measured by using the commercial TG kit and the expression of genes involved in the lipid synthesis was analyzed by qPCR. To measure the *de novo* synthesis of fatty acids in the rats, heavy water (D_2O) was injected intraperitoneally prior to the DATS administration. At 10 days after the DATS administration, dutriated-fatty acids in the plasma, liver and WAT were detected by GC/MS. DATS significantly suppressed the body weight gain in comparison with vehicle administration without affecting the food intake. The expression of lipid synthesis genes Scd1 and Fasn in the liver and the following *de novo* fatty acid synthesis were significantly lower in the DATS group than Vehicle group. In summary, DATS suppresses the lipogenesis through the down-regulation of Scd1 and Fasn genes, which may lead the anti-obesity effect of DATS.

Diallyl trisulfide (DATS), lipid metabolism, Scd1

発表責任者：関　泰一郎（seki.taiichirou@nihon-u.ac.jp）

講演番号：2E01-11
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 09:00～ ミーティングルーム E

7-ketocholesterol が骨格筋のインスリン伝達経路にもたらす影響

Effect of 7-ketocholesterol on the insulin signaling pathway in skeletal muscle

○小鳥井 あおい[1]、柳本 彩[1]、飯島 佳奈[1]、藤原 葉子[2,3]、市 育代[2,3] ([1]お茶大院・ライフ、[2]お茶大・基幹研究院、[3]お茶大・HLI 研)
○Aoi Kotorii[1], Aya Yanagimoto[1], Kana Iijima[1], Yoko Fujiwara[2,3], Ikuyo Ichi[2,3] ([1]Grad. Sch. Life Sci., Ochanomizu Univ., [2]Fac. Core Res., Ochanomizu Univ., [3]Inst. HLI, Ochanomizu Univ.)

目的：食事由来の酸化コレステロールである7-Ketocholesterol（7-KC）はアテローム性動脈硬化症や心血管イベントなどへの関与が示唆されている。また、2型糖尿病患者では血中の7-KCが高値であることが報告されているが、主要なインスリン標的臓器である骨格筋において、7-KCが糖取り込みに及ぼす影響は知られていない。そこで本研究では、培養細胞を用いて7-KCが骨格筋の糖代謝に及ぼす影響とその制御機構について検討した。
方法：C2C12筋管細胞に7-KC（1,10μM）を添加、その6時間後にインスリンを添加し、糖取り込みに対する影響を調べた。グルコース輸送体であるGLUT4の膜移行は、免疫細胞染色で観察した。また、糖取り込みシグナルに関与するインスリン受容体（IR）、AktおよびAMPKのリン酸化は、Western blot法にて解析した。
結果：インスリン刺激によって増加した糖取り込み量は、7-KCを添加した細胞で減少した。インスリン依存的なGLUT4の膜移行も、7-KC添加によって抑制される傾向がみられた。また、7-KCを添加した細胞ではインスリン刺激下においてIRとAktのリン酸化が減少した。一方、AMPKの活性化には7-KCの影響はみられなかった。
考察：7-KCはC2C12筋管細胞において、Aktのシグナル経路を介したインスリン依存的な糖取り込みを抑制することがわかった。これらの結果より、7-KCの高値は糖尿病の病態悪化の要因の1つとなる可能性が示唆された。

Purpose: 7-Ketocholesterol (7-KC) is one of dietary oxysterols and associated with many diseases, such as atherosclerosis and cardiovascular event. Moreover, it has been reported that the plasma level of 7-KC in the type 2 diabetic subjects is higher than that in the healthy subjects. Therefore, we investigated the effect of 7-KC on glucose uptake in skeletal muscle and its mechanism.
Materials & methods: 7-KC (1, 10μM) and insulin were added to C2C12 myotube cells. GLUT4 translocation was observed by immunostaining. P-Akt, p-IR, and p-AMPK were assessed by Western blot.
Results & Conclusions: Insulin-dependent glucose uptake was decreased by 7-KC treatment. Insulin-induced GLUT4 translocation also tended to be inhibited by 7-KC addition. Besides, 7-KC treatment induced decrease of p-IR and p-Akt, whereas, there was no effect on the activation of AMPK. We suggested that inhibition of insulin-induced glucose uptake in skeletal muscle by 7-KC was mediated via Akt signaling pathway.

oxysterol, skeletal muscle, insulin resistance

講演番号：2E01-12
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 09:00～ ミーティングルーム E

脂質代謝改善ペプチド IIAEK（ラクトスタチン）は脂質代謝改善に寄与する腸アルカリフォスファターゼ（IAP）を標的とし、IAP の特異的な活性化及び ABCA1 の下方調節を伴ってコレステロール代謝を改善する

IIAEK targets intestinal alkaline phosphatase (IAP) to improve cholesterol metabolism with a specific activation of IAP and downregulation of ABCA1

○竹内 朝陽[1]、久松 賢太郎[1]、奥村 菜月[1]、杉光 祐紀[1]、柳瀬 笑子[2]、上野 義仁[2]、長岡 利[1]([1]岐阜大応生食品分子機能学、[2]岐阜大応生生物有機化学)
○Asahi TAKEUCHI[1], Kentaro HISAMATSU[1], Natsuki OKUMURA[1], Yuki SUGIMITSU[1], Emiko YANASE[2], Yoshihito UENO[2], Satoshi NAGAOKA[1] ([1]Gifu Univ. Applied Life Science Molecular Function of Food, [2]Gifu Univ. Applied Life Science Bio-organic Chemistry)

当研究室では、牛乳乳清 β-ラクトグロブリンより新規血清コレステロール（CHOL）低減化ペプチドとしてラクトスタチン (IIAEK) を発見した。小腸で IIAEK と相互作用する標的分子を同定するために、当研究室では、蛍光標識した IIAEK を蛍光物質導入により可視化する新規分子プローブ IIXEK を化学合成した。ラット腸粘膜及び脂質ラフト画分に対する IIXEK を用いた光親和性標識実験及び MS 分析により、IIAEK と相互作用する標的分子として腸アルカリフォスファターゼ（IAP）を同定し、IAP の IIAEK 共通結合配列として GFYLFVEGGR を特定した。驚くべきことに、2 mM IIAEK 添加により、Caco-2 細胞の脂質ラフト画分の ALP 比活性及び IAP タンパク質レベルは顕著に増加した。また、分化 Caco-2 細胞への 2 mM IIAEK 添加により、IAP 発現は有意に上昇し、ABCA1 発現は有意に低下した。さらに、8 時間培養 Caco-2 細胞への IAP siRNA 導入により、2 mM IIAEK 添加による ABCA1 mRNA レベルの有意な低下は消失した。以上より、IIAEK は IAP を標的とし、IAP と直接的相互作用を介して、IAP の特異的な活性化及び ABCA1 mRNA レベルの下方調節を伴って、CHOL 代謝改善を発揮する新規情報伝達系を発見した[1]。

IIAEK (Ile-Ile-Ala-Glu-Lys, lactostatin) is a novel cholesterol-lowering pentapeptide derived from bovine milk β-lactoglobulin. However, the molecular mechanisms underlying the IIAEK-mediated suppression of intestinal cholesterol absorption are unknown. Therefore, we chemically synthesized a novel molecular probe, IIXEK, which can visualize a complex of target proteins interacting with photoaffinity-labeled IIAEK by fluorescent substances. Through photoaffinity labeling and MS analysis with IIXEK for the rat small intestinal mucosa and intestinal lipid raft fractions of Caco-2 cells, we identified intestinal alkaline phosphatase (IAP) as a specific molecule interacting with IIAEK and discovered the common IIAEK-binding amino acid sequence, GFYLFVEGGR. Surprisingly, IIAEK drastically increased ALP activity and IAP protein levels in intestinal lipid raft fractions of Caco-2 cells. IIAEK significantly increased IAP mRNA and protein levels while decreasing ABCA1 mRNA and protein levels in Caco-2 cells. Transfection with IAP siRNA counteracted the IIAEK-induced decrease in ABCA1 mRNA levels in Caco-2 cells. In conclusion, we found that IIAEK targets IAP to improve cholesterol metabolism via a novel signaling pathway involving the specific activation of IAP and downregulation of intestinal ABCA1[1].

1. Takeuchi, A. *et al. Nutrients* 12, 2859 (2020)

IIAEK, alkaline phosphatase, photoaffinity labeling

発表責任者：長岡 利（nagaoka@gifu-u.ac.jp）

講演番号：2E01-13
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 09:00～ ミーティングルーム E

プロバイオティクスとバランス良い栄養素を配合したプロテイン摂取による効率的な筋肉増量効果と腸内細菌叢の改善

Efficient muscle gain and improvement of gut microbiome by protein intake containing probiotics and well-balanced nutrients

○鈴木 基生[1]、冨士川 凛太郎[1]、世良 泰[2]、鈴木 啓太[1] ([1]AuB 株式会社、[2]慶應義塾大学　医学部スポーツ医学総合センター)
○Motoo Suzuki[1], Rintaro Fujikawa[1], Yasushi Sera[2], Keita Suzuki[1] ([1]AuB Ltd., [2]Sch. Med., Keio Univ.)

効果的な筋肉形成のためには、タンパク質だけではなくバランスよく栄養を摂取することが必要であり、プロバイオティクスを摂取することも効果的であるということが近年の研究で示唆されている。
今回の研究では、通常プロテイン（ホエイタンパク質 80%+糖質）を摂取するマウス A 群、特性プロテインを摂取するマウス B 群の 2 群で試験を行った。特性プロテインには、タンパク質 50%（ホエイ+ソイ）に、マルチビタミン、マルチミネラル、食物繊維、オリゴ糖、EPA、さらに 29 種類の酪酸菌、乳酸菌、ビフィズス菌を加えた。
2 群は 13 日間に渡って毎日金網に四肢でぶら下がるトレーニングを実施し、日々摂取する通常食とプロテインの合計量が一定になるように制御した。 結果、体重増加率と握力の増加率について B 群はそれぞれ 4.4%と 4.7%高かった。後脚の筋重量については、B 群より C 群の方が 3.7%大きかった。 便検体の菌叢解析とメタボローム解析も実施しているので、筋肉形成と腸内細菌叢との相関についても報告したい。
Recent studies have suggested that not only protein but also balanced nutrition is known to be effective for effective muscle formation, and that probiotics may also be effective.
In this study, two groups, a mouse group A that normally ingests protein (80% whey protein + sugar) and a mouse group B that ingests characteristic protein, were studied. Characteristics Protein includes 50% protein (whey + soy), multiple vitamins, multiple minerals, dietary fiber, oligos. Sugar, EPA, and 29 strains of probiotics were added.
After 13 days training, body weight, grip strength, and muscle mass of group B was higher than group A. The microbiome and metabolite of feces were also studied.

probiotics, protein, muscle

講演番号：2E01-14
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 09:00～ ミーティングルーム E

スピルリナ摂取ラットにおけるタンパク質消化吸収・生体利用解析

Determination of nitrogen balance in spirulina diet-fed Wistar rat

○小林 琢磨[1]、塩地 雄大[1,2]、吉田 卓矢[1,3]、小田切 友佳[3]、笹田 達也[2]、三好 規之[1,3]（[1]静県大院薬食、[2]ビューテック株式会社　掛川バイオセンター、[3]静県大食品栄養）

○Takuma KOBAYASHI[1], Yudai SHIOJI[1,2], Takuya YOSHIDA[1,3], Tomoka OTAGIRI[3], Tatsuya SASADA[2], Noriyuki MIYOSHI[1,3] ([1]Grad. Sch. of Integ. Pharm. Nutr. Sci., Univ. of Shizuoka, [2]Kakegawa Biocenter of VUTEQ Co., Japan, [3]Sch. of Food Nutr. Sci., Univ. of Shizuoka)

スピルリナ（*Arthrospira platensis*）は体長 0.3~0.5 mm ほどのシアノバクテリアの一種である。スピルリナは、栄養素や機能性成分を豊富に含むため、いわゆる健康食品として市場に流通している。特にスピルリナはタンパク質含量が約 6～7 割（乾燥重量当たり）であり、手軽なタンパク質供給源として注目されている。本研究では、スピルリナタンパク質の消化吸収・生体内利用を詳細に解析する目的で、スピルリナ食を与えた Wistar ラットの窒素出納を解析した。雄性 Wister ラット（10 週齢）に無タンパク質食、あるいはタンパク質含量 14%に調製したカゼイン食、乾燥スピルリナ食および生スピルリナ食（各群 n=6）を 10 日間自由摂取させた。4 日目から 7 日目まで代謝ゲージにて 24 時間ごとの採尿、採糞を行い、6 日目および 7 日目に採取した尿および糞便に含まれる窒素量をケルダール法で定量し、生物価（BV）、正味タンパク質利用率（NPU）、消化吸収率（DC）を求めた。その結果、カゼイン食群、乾燥スピルリナ食群、生スピルリナ食群の DC は、それぞれ 96.7±0.6%、83.8±1.3%、85.6±1.3%であり、カゼイン食は乾燥スピルリナおよび生スピルリナ食に比べて有意に高値を示し、スピルリナ細胞壁消化の DC に対する影響が示唆された。カゼイン食群、乾燥スピルリナ食群、生スピルリナ食群の NPU は、それぞれ 72.2±5.7%、72.6±3.2%、66.0±5.3%であり、群間に有意差は認められなかった。しかし、カゼイン食群、乾燥スピルリナ食群、生スピルリナ食群の BV は、それぞれ 74.6±5.8%、86.6±2.6%、77.1±6.0%であり、乾燥スピルリナ食がカゼイン食に比べて有意に高値を示した。これらのことから、乾燥スピルリナ食タンパク質は生体内で利用されやすい可能性が示唆された。現在、特餌摂取（10 日間）後の解剖時に摂取した血液の LC-MS 分析を行い、血中アミノ酸プロファイル解析を行っている。

A cyanobacteria strain spirulina (*Arthrospira platensis*) is a rich source of nutrients and functional food factors, and is therefore widely known as healthy food. Notably, the protein content of spirulina is about 70% (w/w dry), therefore spirulina is one of the promising food materials. However, digestion, absorption, and bioavailability of spirulina proteins are not fully elucidated. In this study, nitrogen balance in spirulina diet-fed rat was evaluated. 10-week-old male Wistar rats were fed protein-free diet, or diet supplemented with casein, dry spirulina, or raw spirulina as a protein source (protein 14%), for 10 days (each group n=6). Rats were placed into a metabolic cage to collect urine and feces, in which nitrogen contents were evaluated by the Kjeldahl method, and the biological value (BV), net protein utilization (NPU), and digestibility coefficient (DC) were determined. As a result, DC of casein diet was significantly higher than that of dry and raw spirulina diet, suggesting effects of spirulina cell wall on intestinal digestion. Although NPU was not different in groups, BV of dry spirulina was significantly higher than that of casein, indicating that protein of dry spirulina might show high bioavailability in *in vivo*. LC-MS analysis of amino acid profiling in blood samples are on going.

Spirulina, Nitrogen balance, Protein

講演番号：2E03-01
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 10:00～ ミーティングルーム E

Bifidobacterium breve N708 株の IL-10 産生誘導能およびその作用機序の解析

Analysis on promotion activity of IL-10 production of *Bifidobacterium breve* strain N708.

○伊木 明美、砂田 洋介、大木 篤史、田辺 創一（日清食品 HD（株）グローバルイノベーション研究センター）
○Akemi IGI, Yosuke SUNADA, Atsushi OKI, Soichi TANABE (Nissin Foods Holdings Co., Ltd Global Innovation Center)

【背景】乳酸菌やビフィズス菌には様々な保健効果が知られており、中でも免疫調節能については広く研究されている。著者らは抗炎症作用を有する 乳酸菌の取得を目的として、樹状細胞を用いた培養上清中 IL-10/IL-12 比を指標に *Bifidobacterium breve* N708 株（N708）を選抜した。さらに、臨床試験において、ストレス起因性の下痢に対する N708 の有効性を確認した(Sunada et al. *Jpn Pharmacol Ther*. 2019)。本研究では N708 の抗炎症作用について詳細に解析するために、ヒト単球様細胞株 THP-1 に対する N708 菌末の IL-10 産生誘導能を評価した。【方法】THP-1 細胞を PMA 刺激下で 48 時間培養し、マクロファージ様細胞へ分化させた。その後、N708 死菌末を添加し、培養上清中の IL-10 濃度を ELISA 法により測定した。更に、THP-1 細胞が N708 を認識する機序を調べるため、貪食作用および自然免疫受容体阻害剤の IL-10 産生に対する影響を調べた。【結果・考察】複数の乳酸菌および ビフィズス菌株について THP-1 細胞からの IL-10 産生誘導能を評価したところ、N708 が高い活性を示した。また、N708 のその活性は、貪食阻害剤あるいは TLR3 阻害剤添加により抑制された。以上の結果から、N708 はマクロファージに貪食され、TLR3 を介して IL-10 産生を誘導し、抗炎症作用を発揮することが示唆された。

[Background] Lactic acid bacteria (LAB) and bifidobacteria are known to have various physiological effects, and their immunomodulatory activity has been widely studied. As an index of the IL-10/IL-12 ratio in the culture supernatant of dendritic cells, we selected *Bifidobacterium breve* strain N708 as a LAB having an anti-inflammatory effect. In this study, we examined the mechanism by which N708 promotes IL-10 production using human monocyte-like THP-1 cells. [METHODS] THP-1 cells were cultured in the presence of PMA and differentiated into macrophage-like cells. Subsequently, those cells were cultured in the presence of heat-sterilized N708 and the concentration of IL-10 in the culture supernatant was measured by ELISA. At that time, it was examined the effect of the addition of inhibitor of phagocytosis and antagonists of each innate immune receptor. [Results] N708 had high IL-10 promotion activity, and its activity was suppressed by the addition of phagocytosis inhibitor and TLR3 antagonist. These results suggest that N708 exerts an anti-inflammatory effect via phagocytosis of macrophages and stimulation of TLR3 to promote IL-10 production.

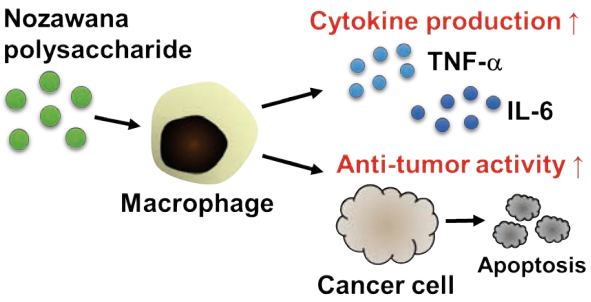
Bifidobacteria, anti-inflammation, cytokine

講演番号：2E03-02
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 10:00～ ミーティングルーム E

野沢菜由来多糖による免疫賦活作用を介した抗腫瘍効果の解析

Anti-tumor activity of polysaccharides from *Brassica rapa* L. mediated by immunostimulatory effects.

○田中 沙智[1]、松井 莉奈[1]、片山 茂[1]、北村 秀光[2]([1]信州大農、[2]北大遺制研)
○Sachi TANAKA[1], Rina MATSUI[1], Shigeru KATAYAMA[1], Hidemitsu KITAMURA[2] ([1]Shinshu Univ., [2]Hokkaido Univ.)



信州の伝統野菜である「野沢菜」は、葉と茎を塩漬けにした野沢菜漬けとして食されている。当研究室では、野沢菜の熱水抽出物による免疫賦活効果を明らかにしているが、その活性成分については同定できていない。一方、植物の葉や茎、果実、海藻に含まれる多糖には免疫賦活作用を介した抗腫瘍効果を示すものが存在する。そこで本研究では、野沢菜由来多糖（NPS）を分離し、マクロファージに作用させた時の免疫賦活効果および抗腫瘍効果について評価した。野沢菜の熱水抽出物からエタノール沈殿法を用いて NPS を調製した。ゲル濾過クロマトグラフィーで精製し、NPS の分子量を解析したところ 100.6 kDa であった。また、HPLC を用いて単糖組成を解析したところ、NPS はガラクトース、グルコースおよびアラビノースなどの単糖類で構成されていることが示された。さらに、マウスマクロファージ様細胞株 RAW264 細胞に NPS を添加し、24 時間培養したところ、培養上清中の TNF-α および IL-6 レベルが増加した。加えて、この培養上清をマウス乳がん細胞株である 4T1 細胞に添加したところ、4T1 細胞のアポトーシスが誘導された。以上のことから、野沢菜由来の多糖はマクロファージの活性化を介して抗腫瘍効果を示すことが明らかになった。

Brassica rapa L. is processed mainly into pickled products called Nozawana-zuke, which are local specialities in Nagano area. We have previously shown the immunostimulatory effects by the hot water extract of *B. rapa* L. However, active components of *B. rapa* L. have not been identified. Polysaccharides from plants, fruits, and seaweeds have been shown the anti-tumor activity mediated by immunostimulatory effects. In the present study, we evaluated the immunomodulatory effects and anti-tumor activity of Nozawana polysaccharide (NPS) mediated by macrophage activation. NPS was isolated from the hot water extract of *B. rapa* L. by ethanol precipitation method. The molecular weight of NPS was determined by gel filtration chromatography, with an average molecular weight of about 100.6 kDa. In addition, the analysis of monosaccharide composition in the NPS by HPLC revealed that it was consisted of galactose, glucose, and arabinose. Furthermore, treatment of RAW264 murine macrophage cell line with NPS not only increased TNF-α and IL-6 production, but also significantly induced apoptosis against 4T1 murine breast cancer cells cultured in conditioned medium from NPS-treated RAW264 cells. Taken together, our results indicate that the anti-tumor activity of NPS on 4T1 cells is mediated by some factors from NPS-stimulated macrophages.

polysaccharide, *Brassica rapa* L., anti-tumor activity

発表責任者：田中 沙智（tanakasa@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：2E03-03
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 10:00～ ミーティングルーム E

酸化コレステロールが樹状細胞の分化と活性化に与える影響の解析

Molecular mechanisms underlying the differentiation and activation of dendritic cells in response to oxysterols

○柳沢 林太郎[1]、浅井 明[2]、戸田 雅子[1] ([1]東北大農、[2]未来科学技術共同研究センター)
○Rintaro YANAGISAWA[1], Akira ASAI[2], Masako TODA[1] ([1]Tohoku Univ., [2]NICHe)

酸化コレステロールは多くの生理的意義を持ち、動脈硬化症においてはマクロファージの炎症化や泡沫化に関与する。樹状細胞はマクロファージと同様に自然免疫系において中心的役割を果たすが、酸化コレステロールが樹状細胞に及ぼす影響についての知見は限られている。本研究は酸化コレステロールが樹状細胞の分化と活性化に及ぼす影響について明らかにすることを目的とした。樹状細胞はマウス骨髄細胞を rmGM-CSF の存在下で培養することにより調製した。この細胞培養系に 7β-hydroxycholesterol や 25-hydroxycholesterol を添加して FACS 解析したところ、樹状細胞の分化マーカーCD11c および活性化マーカーCD40 の発現増強が観察された。このような効果は cholesterol 添加時には観察されなかった。酸化コレステロールの受容体と考えられる liver X receptors (LXRs) や RAR-related orphan receptors (RORs)の合成アゴニストで樹状細胞を刺激すると、ROR 依存的に CD11c と CD40 の発現増強が観察された。以上より、酸化コレステロールは ROR を介した経路により樹状細胞の分化や活性化を促進することが示唆された。現在、樹状細胞における酸化コレステロール作用メカニズムを解析中である。

Oxysterols are a crucial factor in a wide variety of physiological processes and are involved in polarization of macrophages in atherosclerosis. As well as macrophages, dendritic cells (DCs) play an essential role in innate immunity. However, the role of oxysterols in DC's events are not well known. Here, we aimed to elucidate whether and how oxysterols influence on the biology of DCs. To this end, we prepared bone marrow-derived murine dendritic cells (BMDCs) in the presence of rmGM-CSF and stimulated them with oxysterols. FACS analysis showed that 7β-hydroxycholesterol, 25-hydroxycholesterol and other oxysterols upregulated expression of CD11c (DC marker) and CD40 (cell activation marker) on the cell surface of BMDCs. Such an effect could not be induced by cholesterol. When BMDCs were stimulated with synthetic agonists of putative nuclear receptors of oxysterols, stimulation of RAR-related orphan receptors (RORs), but not of liver X receptors (LXRs) enhanced CD11c and CD40 expression on the cell surface. The results suggest that oxysterols promote differentiation and activation of DCs via RORs engagement. We are now investigating in detailed molecular mechanisms of oxysterol-induced DC events.

oxysterol, dendritic cells, differentiation

発表責任者：戸田雅子（masako.toda.a7@tohoku.ac.jp）

講演番号：2E03-04
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 10:00～ ミーティングルーム E

酸化型ビタミン C 修飾タンパク質とヒストン H2B の相互作用メカニズムの解明

The mechanism of the interaction between oxidized vitamin C-modified protein and histone H2B

○板倉 正典[1]、山口 公輔[1]、佐々木 栄太[1]、吉武 淳[2]、柴田 貴広[3]、大野 礼一[4]、永井 竜児[4]、内田 浩二[1] ([1]東大院農生科、[2]名大未来社会、[3]名大院生命農、[4]東海大農)
○Masanori ITAKURA[1], Kosuke YAMAGUCHI[1], Eita SASAKI[1], Jun YOSHITAKE[2], Takahiro SHIBATA[3], Rei-ichi OHNO[4], Ryoji NAGAI[4], Koji UCHIDA[1] ([1]Univ. of Tokyo, [2]Inst.Innovat.Future Soc., Nagoya Univ., [3]Grad. Sch. of Bioagric. Sci., Nagoya Univ., [4]Tokai Univ.)

酸化型ビタミン C(oxVC)は非酵素的にタンパク質を糖化修飾し、その機能性を変化させる。当研究室ではこれまでに、oxVC によって修飾されたアルブミン(oxVC-BSA)がヒストンタンパク質への結合能を獲得すること、マクロファージ細胞膜上に発現するヒストン H2B に結合することで、マクロファージ浸潤を抑制することを明らかにしている。一方で、oxVC-BSA とヒストン H2B との結合メカニズムの詳細は明らかとされていない。そこで本研究では、oxVC 修飾タンパク質とヒストン結合の分子メカニズムの解明を目的として、結合に関与する oxVC による修飾構造の解析および H2B との相互作用様式の検討を行った。リジン側鎖様構造を持つビオチン化ペンチルアミン(PA)を用いて、アミノ酸レベルにおける検討を行った結果、oxVC-PA と H2B との結合が認められた。修飾体の構造的特徴を明らかにするため逆相 HPLC を用いた oxVC-PA の解析を行ったところ、最終糖化産物(AGEs)の特徴である蛍光性(Ex:370 nm/Em:440 nm)を示す画分が H2B 結合性を示すことが明らかとなった。さらに種々の糖代謝物修飾によって PA が H2B 結合活性を獲得することが明らかとなった。またリコンビナント H2B 変異体を用いた検討の結果、塩基性アミノ酸を多く含む H2B-N 末端領域への oxVC-BSA の結合が観察され、H2B-N 末端配列を組み変えたスクランブル変異体においても oxVC-BSA の結合が認められた。以上の結果より、ヒストン結合活性は oxVC 修飾に限らず AGEs に共通した特徴であること、さらにヒストンとの結合における静電相互作用の重要性が示唆された。

Oxidized vitamin C (oxVC) shows the ability to covalently react with proteins and alters their function. We have previously shown that oxVC-modified BSA (oxVC-BSA) could bind to histone H2B and regulate macrophage invasion via the binding to H2B expressing on plasma membrane. However, the precise mechanisms of its binding remain unclear. To gain the insight into the structural properties responsible for H2B-binding, biotin-labeled pentylamine (PA) was incubated with oxVC and the oxVC-modified PA showed significant binding to H2B. Further, the fractionation of oxVC-modified PA by HPLC and solid-phase binding assay revealed that the eluate fractions possessing H2B binding activity exhibited fluorescent property, suggesting the formation of AGEs. In addition, the binding assay using a variety of recombinant H2B including deletion and scrambled mutants showed the importance of electrostatic interaction in the binding between oxVC-proteins with H2B.

Vitamin C, Protein modification, Histone

講演番号：2E03-05
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 10:00～ ミーティングルーム E

ポリフェノール修飾タンパク質によるヒストン結合を介した細胞保護作用

Cytoprotective effect of polyphenol-modified proteins via binding to histone

○山口 公輔[1]、板倉 正典[1]、佐々木 栄太[1]、赤川 貢[2]、内田 浩二[1]([1]東大院農生科、[2]大阪府立大学大学院・生命環境科学研究科)
○Kousuke YAMAGUCHI[1], MASANORI ITAKURA[1], EITA SASAKI[1], Mitsugu AKAGAWA[2], Koji UCHIDA[1] ([1]Univ. of Tokyo, [2]Osaka Pref. Univ.)

近年、エピガロカテキンガレート（EGCG）などのポリフェノールやビタミン C といった抗酸化性食品成分はタンパク質を修飾し、その機能性を変化させることが明らかになりつつある。当研究室では、酸化型ビタミン C 修飾アルブミンがヒストンとの結合を介して抗炎症作用を発揮することを明らかにしている。この知見を踏まえ、酸化型ビタミン C と同様、ポリフェノールにより修飾を受けたタンパク質もまたヒストンと結合し、機能性を発揮するのではと予想した。
まず、複数のポリフェノール修飾タンパク質とヒストンとの結合を固相結合試験にて評価した。その結果、ピロガロール構造を含むポリフェノールがタンパク質を修飾し、ヒストン結合能を与えることが示された。また断片化リコンビナントヒストンを用いた固相結合試験から、ヒストンテール領域の正電荷がポリフェノール修飾アルブミンとの結合に関わることが示された。さらにヒストン誘発性血管内皮細胞傷害がポリフェノール修飾アルブミン処置により軽減されることが示された。
以上の結果より、ポリフェノール修飾によりタンパク質はヒストンとの結合能を獲得すること、またこの結合においてヒストンテール領域の正電荷が重要であることが明らかとなった。またポリフェノール修飾アルブミンはヒストンの細胞傷害性を緩和することが明らかとなり、ポリフェノールのタンパク質修飾を介した細胞保護作用が示唆された。
Antioxidant food components can modify proteins and alter their functions. We have previously shown that oxidized vitamin C-modified albumin exerts anti-inflammatory effect via the binding to histones. Based on this finding, we predicted that proteins modified with polyphenols may also bind to histones and show unique functions.
The proteins were incubated with polyphenols and evaluated their histone-binding by solid phase binding assay. The result showed that some polyphenols containing pyrogallol structure could modify the proteins to provide the histone-binding ability. Furthermore, the LDH assay using endothelial cells revealed that polyphenol-modified albumin mitigated the histone-induced cytotoxicity. These results indicate that polyphenol-modification confers the histone-binding ability on proteins. Further, we found that the polyphenol-modified albumin could mitigate the histone-induced cytotoxicity, suggesting the cytoprotective effect of polyphenols through protein modification.

Polyphenol, Non-enzymatic protein modification, Extracellular histone

講演番号：2E03-06
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 10:00～ ミーティングルーム E

高齢マウスに及ぼす食品コウジカビの経口投与による Th1 応答増強効果

Enhancement effects on Th1 responses of Aged NOD mice by oral administration of koji fungi

○吉澤 昂史[1]、内田 妃音[1]、石塚 悠有[1]、宇田 佳功[1]、関口 昭博[2]、榎本 淳[1,3]([1]群大院理工、[2]群馬産技セ、[3]群大食健康セ)
○ Takashi YOSHIZAWA[1], Hinari UCHIDA[1], Yu ISHIZUKA[1], Yoshinaru UDA[1], Akihiro SEKIGUCHI[2], Atsushi ENOMOTO[1,3] ([1]Department of Chemistry and Chemical Biology, Graduate School of Science and Engineering, Gunma University, [2]Gunma Industrial Technology Center, [3]Gunma University Center for Food Science and Wellness)

【目的】インフルエンザや新型コロナウイルスなどの感染症は、特に高齢者で重篤化しやすく、これを防ぐためには高齢者の免疫力の向上を図る必要がある。演者らはこれまで、食品コウジカビ（黄コウジカビ）を若齢の NOD マウスに経口投与したところ、その Th1 応答が高められることやそのような効果を得るためには最適投与量が存在することなどを見出してきた。本研究では、黄コウジカビの Th1 応答増強効果が高齢 NOD マウスに対しても認められるかどうか検討することを目的とした。
【方法】あらかじめ加熱滅菌処理した黄コウジカビを実験開始時に 56～66 週齢の高齢 NOD マウスに、若齢マウスにおける最適投与量である 1 回あたり 200 あるいは 500 μg/匹の投与量で 2 週間に合計 6 回経口投与した。最終投与 3 日後、これらのマウスの脾臓細胞を抗 CD3 抗体あるいはリポ多糖（LPS）を添加して培養し、その際に産生される各種サイトカイン量を ELISA により測定した。
【結果および考察】黄コウジカビ投与群と未投与群の普段の様子や体重の変化、脾臓細胞数を比較したところ、両群間で有意差はなく、黄コウジカビの経口投与は NOD マウスに健康上の悪影響を与えないものと考えられた。Th1 系の代表的なサイトカインである IFN-γ は LPS 添加時には全く検出されなかったものの、抗 CD3 抗体刺激時には強く産生された。その産生量を黄コウジカビ投与群および未投与群で比較したところ、NOD マウスの性別や経口投与量に関わらず、前者で 1.1～1.8 倍高くなることが明らかとなった。これらの結果から、黄コウジカビは高齢の NOD マウスに対しても、ウイルスなどの細胞内病原菌の排除に有効な Th1 応答を向上させることができると結論づけられた。

We here examined Th1-potentiating effects on aged NOD mice by oral administration of yellow koji. Healthy and prediabetic NOD mice at 56-66 weeks-old were orally given heat-sterilized yellow koji at the doses of 200 or 500 μg 6 times for 2 weeks. The splenocytes were then cultured with anti-CD3 antibody or lipopolysaccharide (LPS), and the culture supernatants were collected and tested for production of IFN-γ by ELISA. Both weights and splenocyte numbers of the NOD mice were almost the same between yellow koji-treated and control mice. High production of IFN-γ was usually observed when the splenocytes were cultured with anti-CD3 antibody, but not with LPS. The splenocytes of the yellow koji-treated mice were secreted significantly larger amounts of IFN-γ compared with those of the control mice. Our findings suggested that yellow koji may also exhibit Th1-potentiating effects on the aged NOD mice, probably resulting in the protection against intracellular pathogens.

Koji fungi, Th1 response, Oral administration

発表責任者：榎本淳（enomoto@gunma-u.ac.jp）

講演番号：2E03-07
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 10:00～ ミーティングルーム E

SFaN による前駆体 SREBP 分解促進作用の解析

Analysis of the accelerated degradation of precursor SREBPs by SFaN

○菊地 瑛登[1]、松永 優輝[2]、小髙 愛未[2]、正路 健太[1]、宮田 慎吾[3]、石神 健[4]、松本 雄宇[2]、鈴木 司[2]、山本 祐司[1,2]、佐藤 隆一郎[3]、井上 順[1,2]([1]東農大院・応生科・農化、[2]東農大・応生科・農化、[3]東大院・農生科・応生化、[4]東農大・生命科)

○Akito KIKUCHI[1], Yuki MATSUNAGA[2], Manami KODAKA[2], Kenta SYOJI[1], Singo MIYATA[3], Ken ISHIGAMI[4], Yu MATSUMOTO[2], Tsukasa SUZUKI[2], Yuji YAMAMOTO[1,2], Ryuichiro SATO[3], Jun INOUE[1,2] ([1]Tokyo Univ. of Agric., Grad. Sch. of Agric. Chem., [2]Tokyo Univ. of Agric., [3]Univ. of Tokyo, Grad. Sch. of Agr. and Life sci., [4]Tokyo Univ. of Agric., Fac. Life Sci.)

【目的】メタボリックシンドロームを代表とする生活習慣病は、脂質代謝制御の破綻を発症基盤とする疾患である。転写因子 SREBP の過剰活性化は過度の脂質合成やインスリンシグナルの低下をもたらし脂肪肝やインスリン抵抗性を惹起することが知られている。我々はこれまでに、SREBP 活性を低下させる食品成分としてスルフォラファン（SFaN）を見出し、SFaN が抗肥満作用を有すること、さらに前駆体 SREBP の分解を促進することを明らかにしてきた。本研究では SFaN による前駆体 SREBP 分解促進機構の解明を目的とした。

【方法】始めに、SFaN による前駆体分解促進がプロテアソーム阻害剤 MG132 処理により影響を受けるか検討した。次に SFaN 処理により前駆体 SREBP-1 のポリユビキチン化が促進するかについて、培養細胞を用いた定法により検討した。SREBP-1 の部分欠失体発現プラスミドを作製し、これらを Huh-7 細胞へ導入後、SFaN による分解を受けるかについて検討した。また、SFaN 処理によってユビキチン化を受けるアミノ酸残基の同定を目指し、質量分析を用いてその候補アミノ酸残基を解析した。候補アミノ酸残基の変異体を作製し、上記と同様に検討を行った。次に SFaN のスルホキシド基側（誘導化しても活性が消失しない）にアルキンを有機合成により導入し、アジドビーズとの反応を行い、SFaN ビーズを作製した。現在、SFaN が前駆体 SREBP に直接結合しているかについて検討を行っている。

【結果】SFaN による前駆体 SREBP 分解は、ユビキチン-プロテアソーム経路が関与しており、SFaN 処理によって前駆体 SREBP のポリユビキチン化が促進された。SREBP の C 末端側の欠失体では SFaN による分解促進が起こらなかった。現在、さらに SFaN による分解に必要な領域を絞り込んでいる。質量分析によって見出した候補アミノ酸残基の変異体（1 カ所）では SFaN による分解が観察された。現在、他の候補アミノ酸の変異体を作製・解析を行っている。SFaN ビーズを用いた検討では、複数の結合タンパク質の同定に成功しており、今後、SREBP との結合について検討する。

SREBPs are transcription factors that play a central role in lipid metabolism regulation. We have found sulforaphane (SFaN) as a food ingredient that suppresses SREBP activity. This study aimed to elucidate the mechanism of the accelerated degradation of precursor SREBPs by SFaN. The precursor SREBP degradation by SFaN was suggested to be via the ubiquitin-proteasome pathway, so we attempted to identify the ubiquitination sites of SREBP. Furthermore, we are currently preparing SFaN beads and investigating whether SFaN binds directly to the precursor SREBP.

SREBP, Sulforaphane, Ubiquitin-Proteasome

発表責任者：井上　順（ji206785@nodai.ac.jp）

講演番号：2E03-08
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 10:00～ ミーティングルーム E

スルフォラファンの新規結合分子の探索

The exploration of new binding molecules of sulforaphan

○小高 愛未[1]、菊地 瑛登[2]、正路 健太[2]、石神 健[3]、松本 雄宇[1]、鈴木 司[1]、山本 祐司[1,2]、井上 順[1,2] ([1]東農大・応生科・農化、[2]東農大院・応生科・農化、[3]東農大・生命科)
○Manami KODAKA[1], Akito KIKUCHI[2], Kenta SHOJI[2], Ken ISHIGAMI[3], Yu MATSUMOTO[1], Tsukasa SUZUKI[1], Yuji YAMAMOTO[1,2], Jun INOUE[1,2] ([1]Tokyo Univ. of Agric., [2]Tokyo Univ. Agric., Grad. Sch. of Agric. Chem., [3]Fac. Life Sci., Tokyo Univ. of Agric.)

【目的】SREBP は脂質代謝調節において中心的な役割を担っている転写因子である。SREBP の過剰な活性化は脂肪肝やインスリン抵抗性に繋がることが知られている。私たちは SREBP 活性を抑制する食品成分としてスルフォラファン (SFaN)を見出している。SFaN は抗酸化作用やがん抑制効果が報告されており、これまでに私たちは SREBP の分解を亢進させることによりその活性を抑制することや肥満抑制効果を示すことを明らかにしている。本研究では SFaN と結合する新規分子を探索し、SFaN が脂質代謝にもたらす効果とその作用機序解明の手がかりを得ることを目的とした。
【方法】まず SFaN のスルホキシド側にアルキン構造を持たせた SFaN 誘導体を有機合成した。合成した SFaN 誘導体のアルキンとアジドビーズのアジド基をクリックケミストリーにて結合させ、SFaN 誘導体ビーズを作製した。ヒト肝癌由来細胞 Huh-7 の細胞溶出液に SFaN 誘導体ビーズを加えて pull down し、SFaN 誘導体に結合したタンパク質を質量分析に供することで結合候補分子を探索した。
【結果】質量分析にて多くの結合候補分子が検出された。現在、候補分子の発現プラスミドを作製して SFaN 誘導体ビーズとの結合の確認を行っている。その中で特に結合が顕著だった分子について、ノックダウンや変異体の作製を通して、脂質代謝との関係性など詳細な解析を行っている。

SREBP is a transcription factor that plays a central role in lipid metabolism regulation. Excessive activation of SREBP is known to lead to fatty liver and insulin resistance. We have found sulforaphane (SFaN) as a food ingredient that suppresses SREBP activity. In this study, we searched for new molecules that bind to SFaN.
First, we synthesized an SFaN derivative having an alkyne structure on the sulfoxide side of SFaN. The SFaN derivative and the azide beads were bonded by click chemistry to prepare SFaN derivative beads. SFaN derivative beads were added to the cell lysate of Huh-7 cells and pulled down.
As a result, many candidate molecules were detected by mass spectrometry. Currently, we are preparing an expression plasmid for the candidate molecule and confirming its binding to SFaN derivative beads. Among them, molecules with remarkable binding are being analyzed in detail, such as their relationship with lipid metabolism, through knockdown and the production of mutants.

sulforaphan, SREBP, lipid metabolism

発表責任者：小高愛未（mk207246@nodai.ac.jp）

講演番号：2E03-09
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 10:00～ ミーティングルーム E

尿酸排出トランスポーターABCG2 を活性化するフィトケミカルの探索・解析

Exploring and analysis of phytochemicals upregulating urate transporter ABCG2

○榎本 泰大[1]、近藤 泰嗣[2]、豊田 優[3]、鈴木 洋史[3]、高田 龍平[3]、薩 秀夫[2]([1]前橋工大院工、[2]前橋工大工、[3]東大病院薬剤部)
○Yasuhiro ENOMOTO[1], Taishi KONDO[2], Yu TOYODA[3], Hiroshi SUZUKI[3], Tappei TAKADA[3], Hideo SATSU[2] ([1]Grad. Sch. of Eng., Maebashi Inst. Technol., [2]Maebashi Inst. Technol., [3]Dept. of Pharm., The Univ. of Tokyo Hospital.)

【目的】尿酸トランスポーターABCG2 は腸管における尿酸排出に大きく関与しており、腸管上皮細胞において尿酸を細胞内から管腔側細胞外へと排出する。そのため、小腸における ABCG2 の発現・活性を亢進することは、血清尿酸値の低下に繋がると考えられるが、そのような作用を有する食品成分に関する報告は今日まであまりなされていない。そこで本研究では、食品成分の中でもフラボノイドをはじめとするフィトケミカルに注目し、ABCG2 の発現を亢進する食品成分を探索するとともに、その制御機構を解析することを目的とした。
【方法・結果】腸管上皮モデル Caco-2 細胞を用いて約 40 種類のフィトケミカルについてスクリーニングをおこなった結果、フラボノイドである Baicalein と Tamarixetin が ABCG2 の転写活性をそれぞれ亢進し、ABCG2 を mRNA およびタンパク質レベルで増加させることを見出した。その背景にある分子機序に迫るため、ABCG2 の発現制御への関与が報告されている転写因子の中から AhR と Nrf2 に着目し、両者を対象とする発現抑制実験をおこなったところ、Tamarixetin の場合 AhR が、Baicalein の場合 AhR と Nrf2 が ABCG2 の発現制御に関わっていることが示唆された。

【Objectives】In the small intestine, ABCG2 mediates urate excretion from the epithelial cells into the intestinal lumen. Enhancing the expression of intestinal ABCG2 is therefore thought to contribute to the reduction of serum urate levels, especially in subjects with hyperuricemia. However, there is little information available on food components that could regulate ABCG2 expression. We herein explored such food components and investigated relating mechanism in the context of transcriptional factor-mediated transcriptional regulation.
【Methods and Results】With a reporter assay using human intestinal epithelial-like Caco-2 cells expressing luciferase under ABCG2 promoter, we evaluated ABCG2 transcriptional activity in the presence of approximately 40 kinds of phytochemicals. We found that two flavonoids (baicalein and tamarixetin) significantly enhanced ABCG2 promoter activity, which was confirmed by biochemical assays both in mRNA and protein levels. Further knockdown experiments focusing on AhR and Nrf2 (transcriptional factors regulating ABCG2 expression) showed that AhR and both of them are partially involved in the upregulation of ABCG2 in the case of tamarixetin and baicalein, respectively.

ABCG2, intestinal epithelial cell, flavonoid

発表責任者：薩　秀夫（satsu@maebashi-it.ac.jp）

講演番号：2E03-10
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 10:00～ ミーティングルーム E

関節固定による筋萎縮時の脂質代謝動態

Lipid dynamics due to muscle atrophy induced by immobilization

○木村 圭佑[1]、森笹 瑞季[1]、水重 貴文[2]、蕪山 由己人[2]、早坂 孝宏[3]、吉田 恵里子[4]、内田 健志[4]、森 司[1]、井上 菜穂子[1]([1]日本大学、[2]宇都宮大学、[3]北海道大学、[4]日本水産（株））
○ KEISUKE KIMURA[1], MIZUKI MORISASA[1], TAKAFUMI MIZUSIGE[2], YUKIHITO KABUYAMA[2], TAKAHIRO HAYASAKA[3], ERIKO YOSHIDA[4], KENJI UCHIDA[4], TSUKASA MORI[1], NAOKO INOUE[1] ([1]Nihon Univ., [2]Utsunomiya Univ., [3]Hokkaido Univ., [4]Nippon Suisan Kaisha)

現代社会は技術の進歩によって運動量の減少、いわゆる不運動が目立ってきている。不運動は筋萎縮を引き起こすことが知られており、特に高齢者では不運動を原因とするサルコペニア患者が増えている。筋萎縮時には骨格筋量の減少や機能の低下が観察され、グルコースや脂質などのエネルギー代謝にも影響を与える。さらに、筋萎縮は癌や糖尿病、肥満などでも確認されていることから、筋萎縮メカニズムの解明は喫緊の課題であるといえる。本研究では廃用性筋萎縮モデルのラットを用いて筋萎縮時の脂質代謝変化の解析を行い、筋萎縮メカニズムを脂質の観点から明らかにすることを目的として研究を行った。その結果、①骨格筋である腓腹筋がわずか 8 日間の後肢関節固定によって廃用性筋萎縮を引き起こすこと、②筋線維タイプに依存せず萎縮が発生することを明らかにした。その後、萎縮に伴う脂質変化を明らかにするため薄層クロマトグラフィー、液体クロマトグラフィー質量分析及び質量分析イメージングによって解析したところ、③トリアシルグリセロール、ジアシルグリセロール、ホスファチジルセリン、及びスフィンゴミエリンが萎縮に伴い増加していることを確認した。さらにこれらの増加した脂質のうち、④特定の脂肪酸を持つ分子種が有意に増加していることを明らかにした。以上のことから廃用性筋萎縮発生時に、脂質の蓄積と特定の脂肪酸の代謝変化が起きることを明らかにした

Inactivity is known to cause muscle atrophy which leads skeletal muscle loss and dysfunction. Muscle atrophy affects energy metabolism; it is confirmed in cancer, diabetes, and obesity. In this study, we focused on lipid metabolism during muscle atrophy, and conducted a study with the aim of clarifying the mechanism of muscle atrophy. As a result, we revealed (1) gastrocnemius muscle caused significant atrophy by only 8 days hind limbs joint immobilization, (2)muscle atrophy occured regardless of muscle fiber type. We demonstrated lipid analyses using thin layer chromatography, liquid chromatography mass spectrometry, and mass spectrometry imaging and revealed that (3) the amount of triacylglycerol, diacylglycerol, phosphatidylserine, and sphingomyelin were significantly increased. We have found that (4) there are molecular specificity of increased molecules with their fatty acid compositions.

Muscle atrophy, Lipid, Immobilization

講演番号：2E03-11
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 10:00～ ミーティングルーム E

不運動・軽運動モデルに対する魚肉タンパク質の効果の検証

Verification of the effect of fish protein for atrophy model and exercise model

○森笹 瑞季[1]、木村 圭佑[1]、水重 貴文[2]、蕪山 由己人[2]、内田 健志[3]、吉田 恵里子[3]、森 司[1]、井上 菜穂子[1]([1]日本大学大学院、[2]宇都宮大学、[3]日本水産（株））
○ MIZUKI MORISASA[1], KEISUKE KIMURA[1], TAKAHUMI MIZUSHIGE[2], YUKIHITO KABUYAMA[2], KENJI UCHIDA[3], ERIKO YOSHIDA[3], TSUKASA MORI[1], NAOKO INOUE[1] ([1]Nihon Univ., [2]Utsunomiya Univ., [3]Nippon Suisan Kaisha, Ltd.)

近年、サルコペニアが大きな社会問題となっており、予防・治療法の確立を目指した栄養学的介入研究が盛んに行われている。我々は、ラットを実験対象として、摂餌タンパク質組成改変による骨格筋量増強モデルの作出を試みている。これまでに健康なラットに Alaska Pollack Protein(以下 APP)食を摂餌させることで腓腹筋が有意に肥大することを明らかにした(Morisasa M et al. *J Oleo Sci.* 2019)。次に「不運動モデル」や「運動との併用」における APP 食の効果を検証したいと考えた。6 週齢 SD ラット雄の右後肢関節をギプス固定し、8 日間飼育することで廃用性筋萎縮モデルを作出した。その後ギプスを外し 7 日間の回復期を設け、その際にカゼイン食と APP 食の二群を作成し、二群間の骨格筋機能を比較することとした。この時、固定した右後肢は「不運動モデル」に値する。一方、左後肢（非固定足）は固定足と比較して軽度の運動負荷がかかる「軽負荷モデル」となっている。そこで本研究は、これらのモデルにおける APP 食の効果を検証することを目的として、解析を行うこととした。腓腹筋を摘出し、免疫組織学染色とウェスタンブロッティングに供した。その結果、「不運動モデル」及び「軽負荷モデル」いずれにおいても APP 食を摂餌したラットの筋線維はカゼイン食と比較して有意に肥大することを明らかにした。一方、それぞれのモデルにおいて活性化しているシグナル伝達経路には特徴があることもわかった。

Sarcopenia syndrome leads to the reduction of skeletal muscle mass and strength, resulting in the decrease of quality of life. It is important to maintain or increase skeletal muscle mass and strength to prevent age-related muscle disorders. Several studies have suggested that nutritional supplement, exercise training, and dietary remedies might be effective treatment for sarcopenia. Our previous study, the gastrocnemius muscle mass in APP-fed rats was significantly higher than that in casein-fed rats. Next, we set two different experimental models, atrophy model and exercise model, to investigate the mechanism of APP induced muscle hypertrophy.

By the use of these two models, we analyzed the cross sectional area of each myosin heavy chain (MyHC) isoform. All MyHC isoforms exhibited hypertrophic features in skeletal muscle of rats fed APP. Interestingly the activated signaling pathway was different between atrophy model and exercise model.

skeletal muscle, hypertrophy, fish protein

講演番号：2E03-12
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 10:00～ ミーティングルーム E

小型ハクジラ類 5 種の可食部における栄養成分特性

Nutrient characteristics of edible portions from five small toothed whale species

○船坂 徳子[1]、伊藤 智広[1]、吉岡 基[1]、田中 清仁[2]、貝 良文[3] ([1]三重大院生資、[2]太地いさな組合、[3]太地町漁協)
○Noriko FUNASAKA[1], Tomohiro ITOH[1], Motoi YOSHIOKA[1], Kiyohito TANAKA[2], Yoshifumi KAI[3] ([1]Mie Univ., [2]Taiji Isana Association, [3]Taiji Fishery Cooperative Union)

【目的】鯨肉可食部の栄養成分については，大型鯨類であるミンククジラとツチクジラにおいて知見があるが，小型ハクジラ類では明らかにされていない．本研究では，小型ハクジラ類の鯨肉食品の付加価値向上を目的として，鯨肉に含まれる栄養成分特性を検討した．
【方法】和歌山県太地町で行われているイルカ追い込み漁業によって市場に水揚げされた小型ハクジラ類 5 種（コビレゴンドウ，ハナゴンドウ，カズハゴンドウ，ハンドウイルカ，スジイルカ）を対象として，筋肉，脂皮，胸びれの一般成分（水分，タンパク質，脂質，炭水化物，灰分），アミノ酸含有量（18 項目），脂肪酸組成（24 項目），n-3 系脂肪酸（EPA，DHA，DPA）の含有量を調べた．
【結果】脂皮の一般成分には全ての項目において有意な種差が認められたが，筋肉と胸びれにおいて種差はみられなかった．また，5 種の筋肉中の成分は畜肉よりも脂質やエネルギーが低く，たんぱく質が高い傾向があった．筋肉におけるアミノ酸含有量は，どの種においてもグルタミン酸が最も多く，次いでロイシンとリジンが多かった一方，脂皮と胸びれではグリシンとプロリンの含有量が多かった. 脂肪酸のうち, すべての種および部位においてオレイン酸の含有割合が最も高かった. ハナゴンドウの筋肉と脂皮における n-3 系脂肪酸の含有量は他種よりも有意に多く，特に脂皮における DHA は 6.6±1.7g/100g と最も多かった．

While the nutrient characteristics of edible portions from cetaceans, such as common minke whales and Baird's beaked whales, are available in the literature, there is little nutrient information for small toothed whales. Thus, we investigated nutritional composition (moisture, protein, fat, carbohydrate, and ash), amino acid content, fatty acid composition, and omega-3 fatty acid levels (EPA, DHA, and DPA) in muscle, blubber, and flippers from five small toothed whale species. We observed significant species differences for all indices in terms of the nutritional composition of blubber. The fat and energy content in the muscle from the five species in our study were lower than cattle and swine meat, but a tendency for higher protein levels was observed. The highest amino acid concentration in the muscle among all five species was of glutamic acid followed by leucine and lysine, whereas in the blubber and flippers, the highest amino acid concentration was of glycine and proline. The highest fatty acid concentration in all species was of oleic acid. Omega-3 fatty acid levels in the muscle and blubber from Risso's dolphins were significantly higher than those of other species, with the highest being 6.6 ± 1.7 g/100 g DHA in blubber.

cetacean, nutritional composition, omega-3 fatty acid

発表責任者：船坂徳子（funasaka@bio.mie-u.ac.jp）

講演番号：2E03-13
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 10:00～ ミーティングルーム E

Lipids prepared from blubber of Risso's dolphin (*Grampus griseus*) attenuates lipopolysaccharide and interferon gamma co-stimulated nitric oxide production in murine macrophage RAW264.7 cells.

○Tomohiro ITOH[1], Noriko FUNASAKA[1], Motoi YOSHIOKA[1], Kiyohito TANAKA[2], Yoshifumi KAI[3] ([1]Grad. Sch. Biores., Mie Univ., [2]Taiji Isana Association, [3]Taiji Fishery Cooperative Union)

【Background & Objective】Whales resources in Japan are widely utilized not only as meat food sources, but other parts are used as crafts materials as well. However, blubber use from the Risso's dolphin (*Grampus griseus*), which is one of the target cetaceans, is less; therefore it is vital to further investigate resource utilization methods. In the present study, we specula that blubber lipids were deeply implicated in whale-scar wound healing and/or suppression of bacterial inflammation. Hence, we and examined the anti-inflammatory effects of sebum components from the Risso's dolphin in murine macrophage RAW264.7 cells.

【Materials and Methods】Blubber samples (16males and 4 females) were obtained from Risso's dolphins, which landed at Taiji Port in Wakayama Prefecture, Japan. Disassembled blubbers were immediately vacuum packed to prevent fat autoxidation, immediately stored at -80°C until lipid extraction. Total lipids from the blubber of Risso's dolphin (L-RD) were extracted using the Bligh & Dyer method. L-RD was dissolved in hexane and stored at -80°C until biological assays. Lipopolysaccharides (LPS) and interferon-γ (IFN-γ)-stimulated RAW264.7 macrophages were treated with L-RD. The nitric oxide (NO) production levels in cell culture supernatants were measured by Griess reagent. The protein and mRNA expression levels of inducible NO synthase (iNOS) and cyclooxygenase-2 (COX-2) in the treated cells were analyzed using western blotting and quantitative real-time PCR methods, respectively.

【Results & Discussion】L-RD treatment significantly (p <0.01) attenuated LPS/IFN-γ costimulated NO production in RAW 264.7 macrophage cells. This anti-inflammatory activity was higher in males than in females, and it was speculated that there was a negative correlation with body length. The mRNA expression of the proinflammatory cytokines, such as tumor necrosis factor-alpha (TNF-α), INF-γ, interleukin (IL)-6, and IL-12 in LPS/IFN-γ costimulated RAW264.7 cells were also decreased by L-RD. Our findings suggested that L-RD may be beneficial for the treatment of inflammatory diseases. To disclose the molecular mechanisms underlying the inhibitory effect of L-RD on LPS/IFN-γ-induced NO production in RAW264.7 cells, we are currently further analyzing Toll-like receptor (TLR) signaling using western blotting.

whales, RAW264.7 cells, anti-inflammatory effect

発表責任者：Tomohiro ITOH（titoh@bio.mie-u.ac.jp）

講演番号：2E03-14
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 10:00～ ミーティングルーム E

自然薯ムカゴ摂取の代謝に対する影響

Effect of Japanese yam propagule on metabolism

○篠崎 文夏[1]、亀井 飛鳥[1]、嶋田 耕育[1]、荒井 綜一[1,2]、阿部 啓子[1,3]（[1]KISTEC、[2]東農大総研、[3]東大院農）
○Fumika SHINOZAKI[1], Asuka KAMEI[1], Kousuke SHIMADA[1], Soichi ARAI[1,2], Keiko ABE[1,3]
([1]KISTEC, [2]Tokyo Univ of Agri, [3]The Univ of Tokyo)

【目的】自然薯ムカゴは、抗酸化能や成分から自然薯の根の部分と同様の機能性を有すると期待される。しかし、それらの生理学的機能を調べた研究はほとんどなかった。本研究は、凍結乾燥および粉末化された自然薯ムカゴの生理学的機能を解明することを目的として実施した。
【方法】自然薯ムカゴは皮ごとスチーム加熱した後凍結乾燥し、粉末とした。マウスは 1 週間馴化後、試験食としてエネルギー比 10%の通常脂肪餌、脂質割合がエネルギー比 45%の高脂肪餌、および高脂肪餌に加熱ムカゴ粉末を添加した餌（５％コーンスターチ置換）を与え 4 週間飼育した。試験開始時、投与 2 週間目および 4 週間目に呼気ガス分析を行い、呼吸商を算出した。また、試験食摂取 4 週間後に採材した肝臓のトランスクリプトーム解析を実施した。
【結果】高脂肪負荷時の呼吸商は通常脂肪摂取時よりも低下したが、高脂肪と自然薯ムカゴの同時摂取時はさらに呼吸商が低下した。このことから、自然薯ムカゴ摂取は高脂肪負荷時の脂肪酸化量を上昇させると考えられた。また、トランスクリプトーム解析では、高脂肪と自然薯ムカゴ同時摂取は糖代謝や脂質代謝関連遺伝子に影響し、高脂肪負荷時の変動を通常時に近づけるように遺伝子発現変動させることがわかった。
　以上の結果から、自然薯ムカゴ摂取は高脂肪負荷時の炭水化物や脂質代謝を調節し、高脂肪負荷の肝臓に対する悪影響の発生を遅延させると考えらえた。

This study aimed to elucidate the physiological function of Japanese yam propagules which were freeze-dried and powdered. A high-fat diet with powdered Japanese yam propagules was administered to mice for four weeks. We examined respiratory quotient and transcriptome. Results of respiratory quotient determination suggested that propagules increased fat oxidation. Transcriptome data show that propagules may reduce the effects of high fat loading and modulate carbohydrate and lipid metabolism. These results show that propagules act to delay the occurrence of hepatic disease by suppressing carbohydrate and fat metabolism disorders in high-fat loaded mice.

respiratory quotient, transcriptome, liver

講演番号：2E03-15
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 10:00～ ミーティングルーム E

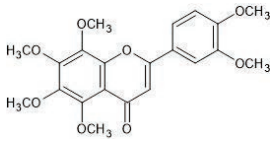
ユコウ果皮に含まれるポリメトキシフラボノイド類の抗真菌活性の検討

Antifungal activities of polymethoxy flavones in the peel of *Citrus yuko*

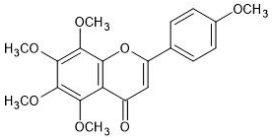
○佐藤 萌[1]、大西 康太[1]、新居 美香[1,2]、黒田 雅士[1]、堤 理恵[1]、阪上 浩[1]([1]徳島大栄、[2]徳農技セ)
○Moe SATO[1], Kohta OHNISHI[1], Mika NII[1,2], Masashi KURODA[1], Rie TSUTSUMI[1], Hiroshi SAKAUE[1] ([1]Tokushima Univ., [2]Tokushima Pref. of Agric,)

ユコウは、徳島県特産の香酸柑橘であり、ユズとダイダイの自然交配種と認識されている。他の柑橘類と比較して、ユコウは貯蔵病害に対する耐性が特に高いが、その理由は明らかとなっていない。本研究では、ユコウ果皮に特徴的な抗真菌成分が含まれている可能性を想定し、その同定を試みた。

ユズなどの腐敗しやすい柑橘類の果皮から 2 種の真菌を単離・培養し、ITS 領域の DNA 配列から菌種を同定した（*Alternaria alternata*, *Penicillium digitatum*)。これら病原性真菌の生育に対するユコウ果皮抽出物の影響を検討したところ、*A. alternata* に対する有意な増殖抑制作用が確認できた。また、果皮抽出物を LC-MS/MS を用いて分析した結果、ユコウ果皮にポリメトキシフラボノイド類である nobiletin と tangeretin が含まれていることが明らかとなった。これらの標品化合物による抗真菌作用を評価したところ、nobiletin 含有培地で *A. alternata* の増殖が有意に抑制された。



Nobiletin



Tangeretin

ポリメトキシフラボノイド類には様々な生理活性が知られているが、本研究により nobiletin の抗真菌作用が明らかとなった。このため、nobiletin は今後新たに防カビ剤として応用できる可能性が期待される。

Citrus Yuko (*C. yuko*), a citrus fruit cultivated in Tokushima, is considered as a natural hybrid species of *C. aurantim* (daidai) and *C. junos* (yuzu). Given that *C. yuko* exhibits a remarkable resistance against postharvest diseases, we investigated the possibility that it produced characteristic antifungal components in the peel.

We first prepared two kinds of plant pathogenic fungi; *Alternaria alternata* and *Penicillium digitatum* to evaluate antifungal activities of *C. yuko*. Interestingly, EtOAc extracts of its peel showed the suppressive effects on conidial germination and mycelial growth of *A. alternata*, but not *P. digitatum*. We then analyzed the extracts using LC-MS/MS system, which revealed that two kinds of polymethoxy flavones, nobiletin and tangeretin, were richly contained in the peel of *C. yuko*. Finally, nobiletin was found to solely attenuate mycelial growth of *A. alternata*.

This study revealed the anti-fungal effect of nobiletin in the peel of *C. yuko*, which suggests its possible usage as a preservative.

Citrus yuko, antifungal activity, nobiletin

発表責任者：堤理恵（rtsutsumi@tokushima-u.ac.jp）

講演番号：2E03-16
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 10:00～ ミーティングルーム E

ユーグレナによる腸内細菌叢の調整に関する研究

A study on the modulation of gut microbiota through *Euglena gracilis* Z

○中島 綾香[1]、佐々木 建吾[2]、佐々木 大介[2]、鈴木 健吾[1]、近藤 昭彦[2,3] ([1]株式会社ユーグレナ、[2]神戸大学、[3]理研 CSRS)
○ayaka NAKASHIMA[1], kengo SASAKI[2], daisuke SASAKI[2], kengo SUZUKI[1], akihiko KONDO[2,3] ([1]euglena Co., Ltd., [2]Kobe University, [3]RIKEN CSRS)

近年、腸内細菌叢の研究が進むにつれ、腸内細菌叢が免疫系や代謝機構に影響を与える重要な環境因子であることが明らかになってきている。ユーグレナ（*Euglena gracilis* Z）は、植物と動物の両方の特徴を持つ単細胞微細藻類で、貯蔵多糖のパラミロン、ビタミン、ミネラル、アミノ酸、脂肪酸などの豊富な栄養素が含まれている。ユーグレナの経口摂取は、メタボリックシンドロームや免疫関連疾患に好影響を及ぼす可能性が報告されている。本研究の目的は、ユーグレナが腸内細菌叢によって代謝されるかどうかを明らかにすることであった。我々は、ユーグレナの投与がヒト大腸微生物叢およびその代謝物産生に及ぼす影響を、*in vitro* ヒト大腸微生物叢モデルを用いて評価した。健常者 11 名から得られた各糞便サンプルにユーグレナを添加し発酵を行った。細菌 16S rRNA 遺伝子配列解析の結果、ユーグレナ投与により *Faecalibacterium* 属の存在量が有意に増加することが明らかになった。また、その代謝物を調べたところ、ユーグレナを投与して発酵させた場合、ユーグレナを投与せずに発酵させた場合と比較して、ヒトの大腸微生物において酪酸の産生が増加することが示された。以上の結果から、ユーグレナによって、腸内細菌叢のバランスが調整される可能性が示された。

Euglena gracilis Z (Euglena) is a single-celled microalgae with characteristics of both plants and animals. It is abundant in nutrients such as paramylon (β-1, 3-glucan), vitamins, minerals, amino acids, and fatty acids, and is used as a food supplement and/or nutritional supplement. The aim of this study was to clarify whether Euglena can be metabolized by microbes, and whether Euglena modulate the human gut microbiota. We evaluated the effects of Euglena administration on the human colonic microbiota and its production of metabolites, using an *in vitro* human colonic microbiota model. Fermentations were started by inoculating each fecal sample obtained from 11 healthy subjects, with or without Euglena. The bacterial 16S rRNA gene sequencing revealed that Euglena administration significantly increased the relative abundances of the genus *Faecalibacterium*. In addition, examination of its metabolites showed that butyrate production was increased in human colonic microbiota following fermentation with Euglena, compared to fermentation without Euglena. Taken together, these findings support the notion that the consumption of Euglena is one dietary strategy for modulating the gut microbiota balance.

Euglena, Paramylon, butyrate

講演番号：2E05-01
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 11:00～ ミーティングルーム E

ウロン酸組成、タンパク質含有量、アルギン酸関連酵素活性のコンブ部位比較

Kelp site comparison of uronic acid composition,protein content and activity of enzyme relating alginate

○平賀 捷悟[1]、川又 澄人[2]、四ツ倉 典滋[3]、垣田 浩孝[1,2]([1]日大院総合基、[2]日大文理、[3]北方生物圏フィールド科学センター)
○ Shogo HIRAGA[1], Sumito KAWAMATA[2], Norishige YOTSUKURA[3], Hirotaka KAKITA[1,2] ([1]Graduate School of Integrated Basic Sciences,Nihon Univ., [2]College of Humanities and Sciences,Nihon Univ., [3]Feild Science Center for Northern Biosphere)

＜緒言＞有用成分の 1 つであるアルギン酸は、褐藻類に多く含まれる細胞間酸性多糖で、2 種類のウロン酸(マンヌロン酸(M)とグルロン酸(G))が重合した直鎖状ポリマーである。また、アルギン酸ゲルの物性は M と G の組成比(M/G 比)に影響され、用途に適した M/G 比のアルギン酸を得る技術は産業的に非常に有用である。しかし、いまだにその技術は完成されていない。そこで本研究ではコンブの各断片中の M/G 比、タンパク質含有量、タンパク質の分子量、これに関連する酵素の活性を明らかにし、部位による変化とこれらを関連づけることを目的とした。＜材料・方法＞北海道厚岸で採取した褐藻類大型海藻ナガコンブを用いた。ナガコンブを付着器から先端にかけて 1 m 間隔で切断し、更に縦に 2 つに切断し、断片を得た。一方の断片をアルカリ抽出し、アルギン酸ナトリウムを得た。このアルギン酸を濃硫酸で加水分解後、中和してアルギン酸加水分解物を得た。加水分解物中の M/G 比は、HPLC によって測定した。もう一方の断片を凍結乾燥後に粉砕し、タンパク質をバッファーにより抽出した。ブラッドフォード法によりタンパク質濃度を測定し、タンパク質含有量を算出した。また、SDS-PAGE によって分子量を測定した。さらに、アルドラーゼ活性を測定した。＜結果・考察＞生育 1 年目、1.5 年目、2 年目のナガコンブについて先端部分の方が M/G 比が低い傾向にあった。また、タンパク質含有量が先端部分の方が高い傾向にあった。この 2 つから M を G に異性化する酵素に関連するタンパク質の存在が示唆された。また、酵素との関連性は現在、調査中である。

＜Introduction＞Alginate is a linear polymer composed two types of uronic acid [mannuronic acid (M) and gluronic acid (G)]. The physical properties of alginate gel are affected by the composition ratio of M and G (M/G ratio).The technology for obtaining suitable alginate with an M/G ratio is very useful industrially. However, the technology has not been completed yet. Therefore, the purpose of this study was to clarify the M/G ratio, protein content, protein molecular weight, and related enzyme activity in each fragment of kelp.＜Materials and Methods＞This study uses *Saccharina longissima* collected in Akkeshi, Hokkaido. The kelp was cut 1 m intervals. One kelp fragment used for alginate extraction and analysis. Other kelp fragment used for protein extraction and analysis.＜Results and Discussion＞The M/G ratio tended to be lower at the tip. In addition, the protein content tended to be higher at the tip. Some enzymes related to such phenomena is currently investigating.

Seaweed, Alginic acid, Uronic acid

発表責任者：垣田浩孝（Kakita.hirotaka@nihon-u.ac.jp）

講演番号：2E05-02
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 11:00～ ミーティングルーム E

日本人の母乳に含まれるシアル酸とオリゴ糖の泌乳期変化

Lactational Changes in Oligosaccharides and Sialic Acid Content in Japanese Breast Milk

○辻森 祐太[1]、福留 博文[2]、樋口 淳一[2]、高橋 朋樹[1]、上野 宏[1]、山口 敏幸[2]、酒井 史彦[2]、鳥羽保宏[1] ([1]雪印ビーンスターク(株)商品開発部、[2]雪印メグミルク(株)ミルクサイエンス研究所)
○ Yuta TSUJIMORI[1], Hirohumi HUKUDOME[2], Jun-Ichi HIGUCHI[2], Tomoki TAKAHASHI[1], Hiroshi UENO[1], Toshiyuki YAMAGUCHI[2], Humihiko SAKAI[2], Yasuhiro TOBA[1] ([1]Research and Development Department, Bean Stalk Snow Co., Ltd., [2]Milk Science Research Institute, Megmilk Snow Bland Co., Ltd.)

【目的】ヒトミルクオリゴ糖（HMO）や母乳中のシアル酸化合物（SA）は、乳児の腸内細菌叢形成や免疫及び認知機能の発達などに関与し、これらの含量には個人差とともに、分娩後日数に伴う泌乳期変化が指摘されている。そこで、今回我々は、泌乳期の異なる日本人授乳婦の母乳を用いて、現代日本人の HMO 濃度及び母乳中総 SA 量の長期的な組成変化について調査した。【方法】2015 年 3 月～2017 年 1 月にかけて分娩後 1～2 ヶ月の成乳及び分娩後 11～12 ヶ月の退縮期乳が収集できた母乳提供者 52 名のうち、退縮期母乳中たんぱく質量が上位と下位の各 10 名ずつ計 20 名を対象者とした。対象者の成乳および退縮期乳（計 40 検体）を解析対象とし、11 種類の主要な HMO 及び母乳中総 SA 量を HPAE-PAD にて測定した。2’-フコシルラクトース（2’-FL）の有無を指標として Secretor の対象者を抽出し、Secretor 母乳中の各濃度と授乳期及び母乳たんぱく質量の関係を二元配置分散分析により解析した（P<0.05）。【結果】日本人母乳の総 SA 含量は、成乳で 28.0～62.6 mg/100mL、退縮期母乳で 18.6～46.5 mg/100mL であり、泌乳期の経過に伴い総 SA 量は減少した。また、2’-FL の濃度より、対象者の 80%が Secretor であると考えられ、Secretor 母乳中 2’-FL の濃度範囲は 23.1～250.9 mg/100ml であった。また、解析の結果、LNFP I, 3-FL, 2’-FL, LDFT, LNnT, LNT, 6’-SL, 3’-SL, 総 SA で泌乳期の影響が、LNFP II, LNDFH I, 3-FL, 2’-FL, LNT でたんぱく質による影響がそれぞれ有意に認められた。交互作用はいずれも認められなかった。

Human milk oligosaccharides (HMO) and sialic acids (SA) in breast milk play various roles in the formation of gut microbiota and immune developments in infants. HMO and SA vary individually throughout lactation. In this study, the concentrations of HMO and total SA were measured in the mature and involutional milk from 20 Japanese mothers by HPAE-PAD. The ranges of total SA contents were 28.0–62.6 and 18.6–46.5 mg/100 mL for the mature and involutional milk, respectively. The total SA content decreased with the lactation. 11 predominant HMO were detected and analyzed for secretor status as defined by the presence of 2’-FL. Secretor was 80% in the participants, and the range of 2’-FL content was 23.1–250.9 mg/100 mL. The lactational periods significantly affected the levels of LNFP I, 3-FL, 2’-FL, LDFT, LNnT, LNT, 6’-SL, 3’-SL, and total SA, and the milk protein level significantly affected the LNFP II, LNDFH I, 3’-FL, 2’-FL, and LNT levels, respectively (P<0.05). No significant interactions were observed in the lactational periods and milk protein levels.

breast milk, human milk oligosaccharides (HMOs), sialic acid

発表責任者：辻森　祐太（yuta-tsujimori@beanstalksnow.co.jp）

講演番号：2E05-03
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 11:00～ ミーティングルーム E

エンドウペクチンの構造と酸性乳飲料安定化能との相関

The correlation between pea pectin structure and stabilizing ability of acidified milk drinks

○東 ほたる[1]、野口 美咲[1]、中澤 昌美[1]、上田 光宏[1]、山田 浩之[2]、福原 宏章[3]、シャカットプラカート ソンボン[4]、福井 健介[3]、長谷川 芳則[3]、阪本 龍司[1]（[1]大阪府大院・生命環境科学、[2]大関（株）、[3]不二製油（株）、[4]不二製油グループ本社（株））
○Hotaru AZUMA[1], Misaki NOGUCHI[1], Masami NAKAZAWA[1], Mitsuhiro UEDA[1], Hiroyuki YAMADA[2], Hiroaki FUKUHARA[3], Sombol JACUTPRAKART[4], Kensuke FUKUI[3], Yoshinori HASEGAWA[3], Tatsuji SAKAMOTO[1] ([1]Life & Environ. Sci., Osaka Pref. Univ., [2]Ozeki Co., [3]Fuji Oil Co., Ltd., [4]Fuji Oil Holdings Inc.)

エンドウ種子はデンプンやタンパク質の供給源として利用され、その副産物であるエンドウ繊維は主に細胞壁多糖から構成される。繊維中のエンドウ由来ペクチン (PP) は現在有効利用されていないが、優れた酸性乳飲料安定化能を有することが近年見出され、先行研究においてその糖鎖構造が解明された [1]。本研究では未だ解明されていないメトキシ基とアセチル基の分布を酵素的手法によって解析し、PP の構造と酸性乳飲料安定化能との相関を検討した。ペクチンの主鎖構造は主にホモガラクチュロナン (HG) とキシロガラクチュロナン (XGA)、ラムノガラクチュロナン-I (RG-I) の 3 領域で構成されており、これらの領域に対して異なる反応性を示す 4 種のエステル基分解酵素を用いて分布の解析を行った。エステル基分解酵素を PP に作用させ、遊離した反応産物量より、PP 中のメトキシ基は XGA 領域に約 73%、HG 領域に約 12%の割合で修飾していることが示唆された。また PP 中のアセチル基は RG-I 領域に約 83%、HG 領域に約 17%の割合で修飾していることが示唆された。酵素によって部分分解した PP について酸性乳飲料安定化能を評価した結果、乳タンパク質との複合体形成にはメトキシ基および高分子主鎖領域である XGA と RG-I が関与していることが明らかになった。一方で今回の系ではアセチル基の関与は認められなかった。また飲料の低粘性維持には長鎖の側鎖アラビナンが寄与していることが明らかになった。

[1] Noguchi et al. (2020) *Carbohydrate Polymers, 231,* 115738.

Pectin is a polysaccharide applied to the food industry as a stabilizer of acidified milk drinks. It generally consists of three regions; homogalacturonan (HG), xylogalacturonan (XGA) and rhamnogalacturonan-I (RG-I). In this study, we enzymatically analyzed the distribution of methoxy and acetyl groups on these regions in pea pectin (PP) and examined the correlation between its structure and stabilization mechanism of acidified milk drinks. Measuring the activities of pectin esterases towards PP, which have different region specificities, we revealed 73% of the methoxy groups was substituted on the XGA, and 12% was on the HG. In addition, we found 83% of the acetyl groups was substituted on the RG-I, and 17% was on the HG. After the evaluation of stabilizing abilities of partially digested PPs, it was revealed the methoxy groups and the polymeric regions (XGA and RG-I) were involved in the complex formation with milk proteins. Furthermore, it was suggested long arabinan side chains bound to the RG-I had a significant effect on maintaining low viscosity of drinks.

pectin, structure, stabilizing ability of acidified milk drinks

講演番号：2E05-04
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 11:00～ ミーティングルーム E

アーモンドオイルの網羅的な脂肪酸分析および機能性脂質の探索

The comprehensive lipidomic analysis and search for functional lipids in almond oil.

○宅見 央子、加藤 和子、釜阪 寛、栗木 隆 (江崎グリコ株式会社)
○HIROKO TAKUMI, KAZUKO KATO, HIROSHI KAMASAKA, TAKASHI KURIKI (Institute of Health Sciences　Ezaki Glico Co., LTD)

【背景・目的】アーモンドオイルは、約 7 割がオレイン酸、約 2 割程度がリノール酸で構成されており、この特徴は一般的に「健康に良い」とされるオリーブオイルと類似している。しかしながら、日本食品標準成分表に記載のある情報以外は不明な点が多い。本研究では、ターゲット解析およびノンターゲット解析によるリピドミクスを行い、アーモンドオイルの特徴の把握および特有の機能性成分の探索を目指した。【方法】分析サンプルとして、①生アーモンドオイル②ローストアーモンドオイル③エクストラバージンオリーブオイルを用意した。機能性成分の一つとして、脂肪酸ヒドロキシル化脂肪酸（FAHFA；Fatty Acid esters of Hydroxy Fatty Acid、以下「FAHFA」と記す）に着目した。FAHFA のターゲット解析では、検量線作製分子として、5-PAHSA を基準とした構成や結合位置の異なる計 9 種の FAHFA 分子、内部標準品として 12-OAHSA-d17 を採用した。【結果・結論】アーモンドオイルとオリーブオイルとでは、トリグリセリドを構成する脂肪酸の結合パターンに違いが見られた。また、アーモンドオイルのノンターゲット解析において、血糖値の改善、糖尿病の予防および抗炎症の効果が期待される FAHFA が検出された。ターゲット解析でより詳細に分析したところ、FAHFA の含有量は生アーモンドオイル、ローストアーモンドオイル、オリーブオイルの順に高く、生およびローストアーモンドオイルの FAHFA は、オリーブオイルのそれと比して、不飽和脂肪酸で構成されるものが多かった（例：OAHLA, OAHOA, LAHLA)。アーモンドオイル中の FAHFA の存在を明らかにするのは本研究が初めてである。いずれもオレイン酸が多いとされるアーモンドオイル(生およびロースト)とオリーブオイルだが、それぞれの脂質には差異があることが明らかになった。

Almond oil is composed of 70% oleic acid, 20% linoleic acid and the other fatty acids. The composition is very similar to that of olive oil which is widely known as “healthy oil”. However, the nutritional information of almond oil is limited. The aim of the present study is to understand the nutritional features of almond oil as well as to search the new functional components, by comprehensive targeted and non-targeted lipidomics analyses. Both analyses revealed that the distributing patterns of fatty acids in almond oil (raw and roasted) and olive oil apparently differed. In addition, Fatty Acid esters of Hydroxy Fatty Acid (FAHFA) was found in both oils and almond oil contained more FAHFA than olive oil.

almond oil, lipidomic analysis, FAHFA

発表責任者：宅見　央子（hiroko.takumi@glico.com）

講演番号：2E05-05
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 11:00～ ミーティングルーム E

光酸化を踏まえたリノール酸およびリノレン酸からのアクロレイン生成経路の解明

Determination of acrolein generation pathways from linoleic acid and linolenic acid: Increase in acrolein generation by photo irradiation

○加藤 俊治[1]、清水 直紀[2]、乙木 百合香[2]、伊藤 隼哉[2]、境野 眞善[2,3]、佐野 貴士[3]、竹内 茂雄[3]、今義 潤[1,3]、仲川 清隆[1,2] ([1]東北大院農・J-オイルミルズ油脂イノベーション共同研究講座、[2]東北大院農・機能分子解析学、[3](株)J-オイルミルズ)
○Shunji Kato[1], Naoki Shimizu[2], Yurika Otoki[2], Junya Ito[2], Masayoshi Sakaino[2,3], Takashi Sano[3], Shigeo Takeuchi[3], Jun Imagi[1,3], Kiyotaka Nakagawa[1,2] ([1]J-Oil Mills Innovation Laboratory, Tohoku Univ., [2]Food and Biodynamic Chemistry Laboratory, Tohoku Univ., [3]J-OIL MILLS, INC.)

【背景】アクロレイン（ACR）は長期的な曝露による発癌性の疑いもあることから、摂取・曝露量に注意が必要なアルデヒドの一つである。ACR の発生源の一つとして植物油の脂肪酸部分の加熱（ラジカル）酸化が証明されており、特に α-リノレン酸（LnA）の酸化が大きく寄与していると考えられている。一方で酸化機構には他にも、主に光などが関与する一重項酸素（$^1O_2$）酸化があるが、$^1O_2$ 酸化物からの ACR 生成についてはほとんど検討されていなかった。近年、我々は脂肪酸の $^1O_2$ 酸化やラジカル酸化によって生成される脂肪酸ヒドロペルオキシド異性体の分解経路の推定を行ってきた。そしてこの推定経路から、リノール酸（LA）の $^1O_2$ 酸化物も ACR の生成源になりうること、そして LnA の $^1O_2$ 酸化物は LnA のラジカル酸化物よりも多量の ACR 生成させることが予想された。よって本研究ではこの仮説を証明するため、LA および LnA の $^1O_2$・ラジカル酸化によって生成される全てのヒドロペルオキシド異性体を調製し、各異性体の分解から生成される ACR 量を比較した。
【方法】LA および LnA を酸化させ、生成したヒドロペルオキシド異性体（9-, 10-, 12-, 13-HpODE および 9-, 10-, 12-, 13-, 15-, 16-HpOTE）を単離精製した。これらの異性体をそれぞれ加熱分解に供し、生成した ACR を GC-MS にて解析した。
【結果と考察】過去の報告と一致して、LA のラジカル酸化物（9-, 13-HpODE）の分解から ACR は検出されなかった。一方で、予想通り LA の $^1O_2$ 酸化物（10-, 12-HpODE）は LnA のラジカル酸化物（9-, 12-, 13-, 16-HpOTE）の約 2~3 倍の ACR を生成した。さらに LnA の $^1O_2$ 酸化物（10-, 15-HpOTE）からラジカル酸化物（9-, 12-, 13-, 16-HpOTE）の約 2~3 倍の ACR が生成された。
本研究は油脂の酸化条件によっては LA も LnA に匹敵する ACR の発生源になりうること、さらに LnA も光（$^1O_2$）酸化によって ACR の生成量を増加させることを示した。重要なこととして、本推定経路はオレイン酸以外のほとんどの多価不飽和脂肪酸が光（$^1O_2$）酸化によって ACR の生成量を増加させることを示唆する。本知見は ACR の生成抑制を以て食品の品質向上に寄与すると期待される。

Acrolein is one of the most toxic aldehydes. While previous studies have suggested that linolenic acid is the origin of acrolein in edible oils, these studies were performed under thermal conditions where only the fatty acid hydroperoxide isomers derived from radical oxidation can be formed. Therefore, in this study, we reinvestigated the acrolein generation pathway through another oxidation mechanism: $^1O_2$ oxidation (type II photooxidation).

Acrolein, Lipid oxidation, Mass spectrometry

発表責任者：加藤俊治（tyunkato@gmail.com）

講演番号：2E05-06
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 11:00～ ミーティングルーム E

加工食品（ポテトチップス）の保存時に進行する脂質酸化とその機構の評価

Evaluation of lipid oxidation mechanism during storage of processed foods (potato chips)

○山田 皓輝[1]、伊藤 隼哉[1]、加藤 俊治[1]、石原 克之[2]、国寄 祐子[2]、仲川 清隆[1] ([1]東北大院農・機能分子解析学、[2]カルビー株式会社)
○Hiroki YAMADA[1], Junya ITO[1], Shunji KATO[1], Katsuyuki ISHIHARA[2], Yuko KUNIYOSE[2], Kiyotaka NAKAGAWA[1] ([1]Food and Biodynamic Chemistry Laboratory, Tohoku Univ., [2]Calbee, Inc.)

【背景】食品脂質の酸化は食品の風味や品質に影響を与えるため、酸化機構の評価や予防法の構築が求められている。食品脂質の主成分であるトリアシルグリセロール（TG）は、酸化することで酸化一次生成物であるトリアシルグリセロールヒドロペルオキシド（TGOOH）となる。その酸化機構には、熱などが主な原因となる自動酸化と、光などが主な原因となる一重項酸素酸化があり、それぞれの酸化機構に応じて異なる TGOOH 異性体が生じる。当研究室では、LC-MS/MS を用いた異性体レベルでの TGOOH の解析法を確立し、食用油脂の酸化機構の評価を達成してきた。本研究では、本法を加工食品である市販の菓子に応用し、一般的な保存が脂質酸化に与える影響の評価を目指した。
【方法・結果】始めに、市販のポテトチップス（PC）に含まれる主要な TG 分子種を検討した。PC から Folch 抽出と固相抽出により TG および TGOOH を抽出し、LC-MS/MS に供した。その結果、パルミチン酸やオレイン酸、リノール酸が主要な TG 構成脂肪酸であることが分かり、本試験ではこれら脂肪酸をランダムに含む TG をターゲット分子種に設定した。次に、保存が PC の酸化に与える影響を評価した。PC を透明（Ctl 群）及び赤色のフィルム（R 群）で包装し、室温・蛍光灯下で 0~60 日間保管した。8 箇所のタイムポイントでサンプリングし、脂質抽出した後、LC-MS/MS にて分析した。その結果、保存前の PC からは TGOOH はほとんど検出されなかった。他方、Ctl 群及び R 群の両方で時間依存的に自動酸化と一重項酸素酸化が共に進行することが分かった。また、どのタイムポイントにおいても、R 群では Ctl 群よりも酸化が抑制されていた。
【考察】本研究によって、LC-MS/MS を用いることで食用油脂に加え、複雑な加工食品でも脂質の酸化機構を評価できる可能性を示した。また、従来、過酸化物価（POV）などで評価されてきた脂質酸化に対する遮光の効果に対して、酸化機構の解析を通じて原因を追求できる可能性を示し、今後品質管理や賞味期限の延長などの様々な点で貢献できると期待される。

In this study, evaluation of lipid oxidation mechanism of processed food（potato chips (PC)）was conducted using LC-MS/MS. It revealed that PC stored under the general condition (room temperature and under fluorescent light) were undergone both auto oxidation and singlet oxygen oxidation. Moreover, these lipid oxidations were prevented by shading with red film. These results indicated the importance of evaluation of lipid oxidation mechanism of processed food. Progress of this study is expected to contribute to extend the shelf life.

lipid oxidation, LC-MS/MS, processed foods

発表責任者：仲川清隆（kiyotaka.nakagawa.c1@tohoku.ac.jp）

講演番号：2E05-07
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 11:00～ ミーティングルーム E

メチルエステル化度の異なるペクチンとの複合体化による β-ラクトグロブリンの高機能化

Functional Improvements in β-Lactoglobulin by Conjugation with Low and High Methoxy Pectin

○加藤 七菜子、好田 正、服部 誠（東農工大農）
○Nanako KATO, Tadashi YOSHIDA, Makoto HATTORI (Tokyo University of Agriculture and Technology)

β−ラクトグロブリン(BLG)は乳化性などの機能特性を有しているため食品素材として有用であるが、アレルゲン性を有するなどの欠点を持つ。BLG を二種類のペクチン(LMP, HMP)と水溶性カルボジイミド(EDC)により結合させ複合体化することで欠点の克服を目指した。また糖含量の等しい複合体を比較し結合させるペクチンの種類による複合体の免疫学的特性の違いについても評価した。BLG : LMP または HMP : EDC=1:1.5 または 2.25:1.75(重量比)で反応させて複合体を調製し、塩析とゲルろ過クロマトグラフィーにより精製した。二種類の精製複合体についてフェノール硫酸法と BCA 法により糖含量とタンパク質含量を、また OPA 法により遊離アミノ基を測定した結果タンパク質対糖比と遊離アミノ基含量がそれぞれほぼ同じことが明らかとなった。精製複合体の免疫原性について BLG、BLG とペクチンの混合物、複合体を BALB/c マウスに免疫し血清中の BLG 特異的抗体価を測定することで評価したところ､両複合体ともに BLG 特異的抗体産生性は有意に低下していたが BLG-LMP の方がその効果が大きかった。本研究の結果ペクチンとの複合体化は BLG の低アレルゲン化に有効であると考えられた。

Beta-lactoglobulin (BLG) is useful as a food material because of its functional properties such as emulsification, but it has defects such as high allergenicity. We aimed to overcome the defects by conjugating with low methoxy pectin (LMP) or high methoxy pectin (HMP) by using water-soluble carbodiimide (EDC). By comparing conjugates with equal saccharide content, differences in the immunological properties of the conjugates depending on the type of pectin to be bound were also evaluated. The conjugates were prepared by reacting BLG: LMP or HMP: EDC = 1:1.5 or 2.25:1.75 (weight ratio) and purified by salting-out and gel filtration chromatography. The saccharide and protein contents of the two purified conjugates were determined by the BCA methods and phenol-sulfuric acid methods, and the free amino groups were determined by the OPA method, and the protein-to-saccharide ratio and free amino group content of the two conjugates were shown to be almost identical, respectively. BALB/c mice were immunized with BLG, a mixture of BLG and pectin, and the conjugates, then BLG-specific antibody reaction of antiserum was evaluated. We found that the production of BLG-specific antibodies was significantly reduced in both conjugates, but the effect was greater for BLG-LMP. The present study indicates that conjugating with pectin is effective in lowering the allergenicity of BLG.

β-lactoglobulin, protein conjugation, pectin

発表責任者：服部誠（makoto@cc.tuat.ac.jp）

講演番号：2E05-08
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 11:00～ ミーティングルーム E

カルボキシメチルセルロースとの複合体化による β-コングリシニンの高機能化

Functional improvements in β-conglycinin by conjugation with carboxymethylcellulose

○田中 綾、溝渕 響子、好田 正、服部 誠（東農工大）
○Aya TANAKA, Hibine MIZOBUCHI, Tadashi YOSHIDA, Makoto HATTORI (Tokyo Univ. of Agriculture and Tech.)

【目的】大豆タンパク質の主成分である β-コングリシニンは様々な機能特性を有する食品素材である一方で、強力なアレルゲン性を有することから利用が制限されている。そこで、本研究では架橋剤（EDC）を用いて β-コングリシニンとカルボキシメチルセルロース（CMC）を複合体化し、β-コングリシニンの機能特性の向上とアレルゲン性の低減を達成することを目的とした。
【方法および結果】β-コングリシニン、CMC および EDC を 0.9% NaCl 溶液（pH 7.0）中で混合し、4℃で 24 時間反応後、蒸留水に対して透析し、凍結乾燥に供することで β-コングリシニン-CMC 複合体を得た。複合体の生成は SDS-PAGE により確認した。機能特性として、濁度法により乳化性を評価したところ、複合体化による改善が認められた。免疫学的特性としては、BALB/c マウスを免疫し抗血清を得て、非競合 ELISA を用いて免疫原性を評価した。その結果、複合体を免疫した群における抗 β-コングリシニン抗体産生量の低下が見られた。以上により、本研究の手法が β-コングリシニンの機能特性の改善および低アレルゲン化に有効であることが明らかとなった。

Objective: β-conglycinin, the main component of soybean protein, is a food material with various functional properties. However, its use is limited due to its strong allergenic properties. In this study, we created β-conglycinin-carboxymethylcellulose (CMC) conjugates using cross-linker (EDC) to achieve improvement of functional properties and reduction allergenicity of β-conglycinin.
Methods and Results: β-conglycinin, CMC, and EDC were mixed in 0.9% NaCl solution (pH 7.0), reacted at 4°C for 24 hours, dialyzed against distilled water, and lyophilized to obtain the β-c
onglycinin-CMC conjugates. The formation of the complex was confirmed by SDS-PAGE. Emulsifying ability was evaluated by the turbidity method, and improvement by conjugation was observed. For immunological properties, antisera were obtained by experiments in BALB/c mice and evaluated for immunogenicity using a non-competitive ELISA. The results showed a decrease in anti-β-conglycininin antibody production in the group immunized with the conjugates. In conclusion, the method of this study was effective in improving the functional properties and reducing allergenicity of β-conglycinin.

β-conglycinin, functional improvements, protein conjugation

発表責任者：服部誠（makoto@cc.tuat.ac.jp）

講演番号：2E05-09
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 11:00～ ミーティングルーム E

メイラード反応を利用したペクチンとの複合体化による β-コングリシニンの高機能化

Functional improvements in β-conglycinin with pectin by the Maillard reaction

○根上 拓、西山 まなみ、好田 正、服部 誠（東農工大）
○Taku NEAGARI, Manami NISHIYAMA, Tadashi YOSHIDA, Makoto HATTORI (Tokyo Univ. of Agriculture and Tech.)

【目的】β-コングリシニンは大豆の主要なタンパク質であり、様々な機能性が報告されている。しかし、弱酸性条件下で機能性が低下することや、強力なアレルゲン性を有することが問題となっている。そこで本研究では、メイラード反応を用いて、β-コングリシニンと多糖との複合体を創出し、β-コングリシニンの機能性の向上することを目的としている。多糖としてメチルエステル化度の異なる２種類のペクチン(LMP、HMP) を用いた。
【方法】β-コングリシニン：糖＝1：4.9 となるように β-コングリシニンを LMP、HMP とともに混合した。試料を 65℃、RH 79%で 5、7 日間それぞれメイラード反応させることで、2 種類の複合体を得た。円偏光二色性の測定により、複合体の二次構造を解析した。乳化性は濁度法を用いて評価した。非競合法 ELISA で免疫原性を評価した。
【結果】円偏光二色性測定の結果、β-コングリシニンの二次構造が変化していることが示唆された。乳化性は２種類の複合体ともに有意に向上した。抗 β-コングリシニン抗体産生量は β-コングリシニン-LMP 複合体で有意に低下した。本研究の手法は β-コングリシニンの加工に有用であると考えられた。

[Purpose] β-conglycinin is a major soy protein with various functions. However, there are problems such as reduced functionality under mild acidity and strong allergenicity. Therefore, the purpose of this study is to prepare conjugates of β-conglycinin and polysaccharide by using the Maillard reaction and to improve the functionality of β-conglycinin. Two types of pectins (LMP and HMP) with different degrees of methyl esterification were used as polysaccharides.
[Method] β-conglycinin was mixed with LMP and HMP so that β-conglycinin: saccharide = 1: 4.9. The Maillard reaction of the sample was carried out at 65℃ at RH 79 % for 5, 7 days to prepare two types of conjugates. The secondary structure of conjugates was analyzed by measuring circular dichroism. Emulsifying ability was evaluated using the turbidity method. Immunogenicity was evaluated by non-competitive ELISA.
[Results] As a result of the circular dichroism measurement, it was suggested that the secondary structure of β-conglycinin was changed after conjugation with LMP and HMP. The emulsifying property was significantly improved in both conjugates. Anti-β-conglycinin antibody production was significantly reduced in β-conglycinin-LMP conjugate. The method of this study was considered to be useful for the processing of β-conglycinin.

β-conglycinin, functional improvements, protein conjugation

発表責任者：服部誠（makoto@cc.tuat.ac.jp）

講演番号：2E05-10
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 11:00～ ミーティングルーム E

オボアルブミンおよびその他卵白タンパク質の加熱ゲル形成への寄与

Contribution of ovalbumin and other proteins on the gelation of egg white

○小山 翔大[1,2]、辻井 良政[2,3]、高野 克己[3]、半田 明弘[2,4]（[1]東京農大院応生、[2]東京農大キユーピーエッグイノベーション、[3]東京農大応生農化、[4]キユーピー（株））
○Shota KOYAMA[1,2], Yoshimasa TSUJII[2,3], Katsumi TAKANO[3], Akihiro HANDA[2,4] ([1]Grad. Sch. Appl. Biosci., Tokyo Univ. Agric., [2]Kewpie Res. Div. Egg Innov., Tokyo Univ. Agric., [3]Fac. Appl. Biosci., Tokyo Univ. Agric., [4]Kewpie Corp.)

卵白タンパク質は加熱に伴う変性および凝集により、3 次元のネットワーク構造に水を保持したゲルを形成する。卵白タンパク質には、オボアルブミン（54%）、オボトランスフェリン（12%）、リゾチーム（3.4%）などによって構成されるが、それらがどのようにゲル形成および物性発現に寄与するかに関しては不明である。

本研究では、液卵白の加熱ゲル形成におけるオボアルブミンやオボトランスフェリンおよびリゾチームの寄与について検討した。生卵白を加熱処理（64℃, 10 min）および遠心分離にてオボトランスフェリンおよびリゾチームを除去し、オボアルブミンを主成分とする卵白溶液（OLdEW）を調製した。電気泳動、表面疎水性測定、および示差走査熱量分析の結果より、OLdEW 溶液中のオボアルブミンの含量と分子構造は生卵白のそれらとほぼ同等であった。生卵白と OLdEW を用いて加熱ゲルを調製し、テクスチャープロファイルおよび微細構造を比較した。その結果、OLdEW ゲルは生卵白ゲルと比較して、繊維状のネットワークの割合が大きかった。生卵白ゲルは有意硬く、OLdEW ゲルは復元性および弾力性が高かった。保水性は両者で同等であった。以上の結果より、オボアルブミンは加熱ゲルの保水性および復元力に寄与することが示唆された。一方、オボトランスフェリンおよびリゾチームは、オボアルブミンの繊維状ネットワーク形成に影響し、ゲルの強度を増加させるが、ばね性や復元力を低下させることが示唆された。

In this study, we investigated the role of ovalbumin, ovotransferrin, and lysozyme, the major proteins in heat-induced gelation of egg white. OVT and LYZ removed egg white (OLdEW) solutions were prepared from raw egg white (REW) subjected to heat treatment at 64°C and centrifugation. OLdEW had almost the same native-OVA as in REW, confirmed by gel electrophoresis, differential scanning calorimetry, and surface hydrophobicity measurement. Texture profile analysis, syneresis rate measurement, and scanning electron microscopic observation were performed for the heat-induced gels. OLdEW gel had more porous and fibrous networks, resulting in less hardness, more resilience, and equivalent water holding capacity compared to the REW gel. These results suggest that OVA contributes to the water holding capacity and resilience of the gel, while OVT and LYZ contribute to enhanced gel hardness.

egg white, ovalbumin, gelation

発表責任者：半田明弘（akihiro_handa@kewpie.co.jp）

講演番号：2E05-11
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 11:00～ ミーティングルーム E

大豆乾燥ストレスタンパク質・デハイドリンが豆腐カード形成能に及ぼす影響

Effect of soybean drying stress protein dehydrin on 'tofu' curd formability

○瀬崎 真由[1]、岡 大貴[2]、高野 克己[2]、辻井 良政[2]([1]東京農大院応生、[2]東京農大応生農化)
○Mayu SEZAKI[1], Daiki OKA[2], Katsumi TAKANO[2], Yoshimasa TSUJII[2] ([1]Grad. Sch. Appl. Biosci., Tokyo Univ. Agric., [2]Fac. Appl. Biosci., Tokyo Univ. Agric.)

大豆中の乾燥ストレスタンパク質・デハイドリンはタンパク質食品の加熱時の歩留まり向上効果や解凍時の離水抑制効果があることが示されてきた。今回は、デハイドリンが豆腐カード形成能に及ぼす影響について検討を行った。まず、デハイドリンの金属イオン結合性が豆腐形成能に及ぼす影響を、にがりを用いて検討したところ、デハイドリン 1mol に対して Ca が 1.38mol、Mg が 1.97mol の割合で結合していることが示唆された。しかし、タンパク質変性抑制効果の指標となる乳酸脱水素酵素(LDH)の活性測定を行ったところ、Ca、Mg が結合してもデハイドリンの変性抑制効果は損なわれないことが示唆された。そこで未加熱豆乳および加熱豆乳に対してデハイドリンを添加して豆腐を調製し、破断応力を豆腐カードの硬さとして評価した結果、イオン結合量を考慮しても未加熱豆乳ではデハイドリン添加により豆腐が有意(Tukey、$\rho < 0.05$)に柔らかくなった。一方、加熱豆乳に対してはデハイドリン添加で有意な差はみられなかった。これらのことから、デハイドリンは豆腐凝固時よりも豆乳加熱時に大豆タンパク質に強く影響を与えていることが示唆された。

Dehydrin has been reported to have an effect of improving yield on heat-treatment and suppressing water separation of the thawing in protein foods. We investigated the effect of dehydrin on formability of ‘tofu’. First, we investigated the effect of the metal ion binding property of dehydrin on the formability of ‘tofu’ by using bittern (coagulant). As a result, it was suggested that Ca and Mg were bound at a ratio of 1.38 mol and 1.97 mol to dehydrin 1mol. However, it was suggested that the denaturation suppressant effect of dehydrin was not spoiled even if Ca and Mg were bound. Therefore, we made ‘tofu’ that added dehydrin to unheated or heated soymilk and evaluated that hardness. As a result, even considering the quantity of ionic binding, in unheated soymilk, the ‘tofu’ significantly softened by addition of dehydrin. On the one hand, the addition for the heating soymilk didn't. These results suggest that dehydrin affected soy protein at the time soymilk heating than ‘tofu’ coagulating.

metal ion, coagulation, denaturation inhibitory effect

発表責任者：岡大貴（d3oka@nodai.ac.jp）

講演番号：2E05-12
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 11:00～ ミーティングルーム E

梨幼果抽出成分による出芽酵母の寿命延伸効果と有効成分の検討

Effect of extending the chronological lifespan by immature pear extract and its constituents on budding yeast

○村田 和加惠[1,2]、藤井 雄三[1]、藤田 憲一[2]、山口 良弘[2]、田中 俊雄[2,3]、荻田 亮[2,3]([1]米子高専、[2]阪市大院・理、[3]阪市大・健康研セ)
○ Wakae MURATA[1,2], Yuzo FUJII[1], Ken-ichi FUJITA[2], Yoshihiro YAMAGUCHI[2], Toshio TANAKA[2,3], Akira OGITA[2,3] ([1]Yonago Natl. Coll. Technol, [2]Grad. Sch. Sci., Osaka City Univ, [3]Res. Center. Urban Health Sports, Osaka City Univ.)

近年，日本社会の高齢化や健康ブームなどと相まって，健康寿命の延伸に向けた関心が高まっている．人の健康を阻害する一つの要因として，細胞老化による免疫機能の低下や，活性酸素種の影響による DNA の損傷など，細胞機能の低下に起因する加齢関連疾患が挙げられる．細胞寿命の延伸や，細胞機能の維持についての研究は多岐にわたり進められており，その一つとして，寿命を延伸させる効果を付与する成分の探索とその応用が期待されている．本研究では，ヒト寿命の決定機構と共通性を有することから寿命・老化研究に適したモデル細胞であるとされている出芽酵母を用いて，梨果実の抽出液，および梨果実の代表的な成分として報告されている数種の化合物の細胞寿命の延伸効果を検討した．

液体培地中で出芽酵母を培養し定常期に至った後，継続して同一の液体培地中にて培養した酵母からコロニー形成が可能な生存細胞の割合をコロニーカウント法により調べ，経時寿命判定の指標とした．また，Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) 試験によって出芽酵母の mRNA の発現量を分析し，梨抽出成分が及ぼす遺伝子レベルでの影響を評価した．

実験の結果，梨幼果の水抽出成分を供した場合コントロール細胞と比べて著しく出芽酵母の経時寿命が延伸することが認められた．さらに RT-PCR によって老化関連遺伝子の mRNA の転写量について調べたところ，梨幼果の水抽出成分を供した細胞ではヒト長寿遺伝子(SIRT1) の相同遺伝子とされている *SIR2*，および *SIR4* の発現量に増加傾向が認められた．さらに，梨幼果の含有成分である化合物について出芽酵母の経時寿命延伸効果―を調べたところ，methyl *trans-p*-coumarate の添加が出芽酵母の経時寿命を延伸させることが判った．

以上の結果から，梨幼果の成分は寿命延伸あるいは老化に関連する数種の mRNA の転写活性の亢進を介して出芽酵母の経時寿命を延伸させる活性を示すことが判った．また梨幼果に含まれる構成成分のうち，methyl *trans-p*-coumarate が出芽酵母の経時寿命延伸効果に関与している可能性が示唆された．

Given the increase in the aged population, aging-related diseases are on the rise. Cellular senescence, the decline in cellular function due to aging, causes the gradual loss of physiological functions, leading to several cellular senescence-related chronic diseases such as metabolic syndrome, cardiovascular disease, cancer, osteoporosis, diabetes, and hypertension, which negatively affect the quality of human life. Exposure of unripe pear fruit extract significantly prolonged the chronological lifespan of the yeast compared with that of untreated yeast cells.

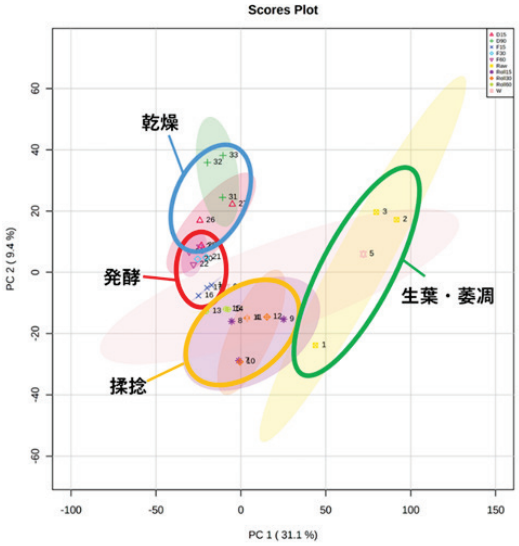
Saccharomyces cerevisiae , Chronological lifespan, sirtuin gene

講演番号：2E05-13
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 11:00～ ミーティングルーム E

LC-MS を用いた紅茶製造時における成分変化に関する網羅的解析

Comprehensive analysis of component changes during black tea processing using LC-MS

○伊藤 歩未[1]、柳瀬 笑子[1,2] ([1]岐阜大院自然科技、[2]岐阜大応生)
○Ayumi ITO[1], Emiko YANASE[1,2] ([1]Graduate School of Natural Science and Technology Gifu Univ., [2]Faculty of Applied Biological Sciences Gifu Univ.)



発酵茶において、茶カテキン類は酸化酵素により酸化され、重合体に変換される。しかしながら、発酵茶中の大半を占める高分子ポリフェノールの化学構造は明らかになっていない。先の研究では重合体の構造の解明のため、2 量体に着目してきた。しかし、酸化によるさらなる重合化が見られなかったことから、高分子ポリフェノールは 2 量体が生成するのとは異なる機構で生成している可能性が示された。本研究では高分子化の新たな鍵中間体を発見するため、紅茶製造時の成分変化を多変量解析を用いることで追跡した。

紅茶製造の各工程でサンプリングを行い、UPLC-MS を行った。得られたデータについて主成分分析を行った。スコアプロットでは製造工程が進むとともにプロットが移動している様子が確認できた。カテキン類の変化は酵素によるものが大きい考えられたため、OPLS-DA による成分の比較は生葉と発酵後期で行い、発酵後期で多い成分を検出した。マスクロマトグラムの面積を比較するとカテキン類は揉捻、発酵過程で減少していた一方、発酵後期で多い成分は揉捻、発酵過程で増加していた。また、これらの成分の MS / MS 測定を行うと、カテキン由来であることが示唆された。

In black tea manufacturing, catechins are oxidized, thus some dimers and polymers are formed. However, the chemical structures of these polymers are not identified. We investigated the mechanisms of polymerization by focusing catechins dimers. However, no polymerization was observed when these dimers was further oxidized. The polymer may have been formed by a different mechanism from the formation of these dimers. In this study, our purpose is discovering new key intermediates for polymerization by tracking the compounds changes during actual tea production, focusing fermentation process, by comprehensive analysis using LC-MS and applied to metabolomics analysis. In PCA, the plots were grouped by manufacturing stage in the score plot. We found some markers from OPLS-DA comparing the fresh leaf and the fermentation process.

black tea, principal component analysis, catechins

講演番号：2E05-14
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 11:00～ ミーティングルーム E

インゲンマメ多糖類の乳化性と乳化機構の解析

Emulsification property and mechanism of kidney bean polysaccharides

○酒井 円香[1]、西山 節子[2]、木田 晴康[2]、中村 彰宏[1] ([1]茨城大学 、[2]不二製油グループ本社)
○Madoka Sakai[1], Setsuko Nishiyama[2], Haruyasu Kida[2], Akihiro Nakamura[1] ([1]Ibaraki Univ., [2]FUJI OIL HOLDINGS INC.)

近年、食品のクリーンラベル化に伴い高機能な天然乳化剤が求められている。アラビアガムは天然乳化剤の中でも高機能で食品への利用が多いが、供給が不安定である。本研究では、安定供給が可能なインゲンマメに注目した。インゲンマメ繊維から水溶性のインゲンマメ多糖類（以下、KPS）を抽出し、乳化性と乳化機構を解明することで、アラビアガム代替乳化剤としての可能性を検討した。

系中濃度2.5% レモンオイル、2.5% KPS の配合で超音波ホモジナイザーを用いてO/W 乳化物を調製した。乳化活性が最も高かったのは、インゲンマメ繊維からpH 4、120 ℃、90 分の条件で抽出したKPS（以下、KPS-4)で、乳化物はアラビアガムで調製した乳化物に近い粒子径であった。また、4 ℃で1ヶ月保存後も粒子径が安定であったことから、KPS-4はアラビアガムと同等の乳化活性と乳化安定性を持つことが分かった。更に、乳化粒子のζ-電位の値から、強い負の静電反発により油滴粒子が安定化していると推測された。

続いて、KPS のエステル基と共存タンパク質に注目して乳化機構を解析した。アルカリ鹸化処理でウロン酸エステル化度が異なるKPS を調製した。乳化活性を比較すると、エステル化度の低下に伴い低くなった。さらに、KPS 乳化物を遠心分離して得た油相成分は水相成分より疎水性アミノ酸の含量が高い傾向にあった。以上のことから、KPS のウロン酸エステル基及び共存タンパク質が疎水領域、多糖類糖鎖が親水領域として乳化状態を形成すると推察された。尚、乳化物のSEM 観察像よりKPS 乳化物表面に多糖類によるものと思われる積層構造が確認でき、この推察を支持していた。

Gum arabic (GA) has been used as a natural food emulsifier, however, its unstable supply is still a big problem. In this study, we investigated whether the kidney bean polysaccharide (KPS) extracted from kidney beans, which supply constantly in the world, could use as an alternative emulsifier for GA. The oil in water emulsions were prepared by using sonic homogenizer, composed of 2.5 % lemon oil and 2.5 % KPS. KPS-4, which was extracted at pH 4, 120°C, 90 min from the kidney bean fiber, had high emulsification ability and stability as well as GA. The emulsification mechanism of KPS was further studied. A positive correlation was observed between esterification degree on uronic acid and emulsifying activity. The KPS fraction adsorbed at a surface of oil droplets was rich in hydrophobic amino acids. From these results, it was presumed that KPS expressed emulsifying activity by adsorbing oil droplets with uronic acid esters and proteins as hydrophobic groups and by covering the surface of oil droplets with polysaccharide chains as hydrophilic groups.

kidney beans, polysaccharide, emulsification

講演番号：2E05-15
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 11:00～ ミーティングルーム E

チーズ中の環状ジペプチド生成に対する熟成工程の影響

The effect of ripening process on cyclic dipeptide formation in cheese

○大塚 祐季[1]、阪地 満帆[1]、柏木 丈拡[1]、島村 智子[1]、受田 浩之[2]([1]高知大・農、[2]高知大・地域創造セ)

○Yuuki Otsuka[1], Michio Sakaji[1], Takehiro Kashiwagi[1], Tomoko Shimamura[1], Hiroyuki Ukeda[2] ([1]Faculty of Agriculture and Marine Science, Kochi University, [2]Center for Regional Sustainability and Innovation, Kochi University)

環状ジペプチドは、直鎖ジペプチドの N 末端、及び C 末端が脱水縮合したジケトピペラジン構造(DKP) を基本骨格とする物質群であり、焙焼・発酵食品中に豊富に含まれている。DKP は過去にチーズ中の苦味成分として認識されてきたが、近年では抗菌作用や血流改善作用等種々の生理活性が報告され、機能性成分としても注目される化合物である。しかし食品中における DKP 生成機構に関する詳しい検討例は少なく、不明な点が多いのが現状である。そこで本研究では、各種チーズ中 DKP 含量を比較するとともにチーズ中の DKP 生成に対する熟成工程の影響について考察した。

LC-MS/MS を用いた 42 種類の DKP を対象とした測定の結果、熟成工程を伴うチーズが未熟成チーズと比べ、DKP 含量・種類ともに高い値を示し、DKP の生成と熟成の間には深い関連があると推察された。次にチーズの主要タンパク質であるカゼインにプロテアーゼを添加し、チーズ熟成のモデル試験を実施したところ、酵素分解されたカゼインから 25 種類の DKP が生成された。従って DKP の生成にはタンパク質の低分子直鎖ペプチドへの分解とそれに続く DKP への環化が重要であると示唆された。さらにカゼインの一次構造とモデル試験で検出された DKP 及びチーズ中 DKP の構成アミノ酸との比較を行ったところ、良好な一致が認められた。以上のことから、チーズに含まれる DKP の殆どはカゼインに由来し、DKP 生成の主要因はプロテアーゼによるタンパク質分解であることが判明した。

Cyclic dipeptides, 2,5-diketopiperazines (DKPs), have been known to occur in various fermented and/or heated food, and are also well-known bitterness components. Recently, DKPs attracted attentions as bioactive components. However, there has been little study about DKPs profile and formation mechanism in cheese, which is one of the typical fermented food. Herein, we attempted to compare DKPs contents in various types of cheeses and elucidate the effects of ripening process for the formation mechanism of DKPs in cheese.

In results of determining the contents of 42 kinds of DKPs by LC-MS/MS, it was observed that ripened cheeses had higher DKPs contents than unripened cheese. In case of Gouda cheeses with different ripening periods, both the total content and types of DKPs increased with the ripening period. In the model system of ripening process of cheese using casein and two proteases (trypsin and chymotrypsin), 25 kinds of DKPs were formed and the types of proteases affected DKPs profile and amount. Additionally, amino acids constituting DKPs detected in cheese was almost matched with amino acid sequences of casein. Based on these results, the ripening process was important factor for DKPs formation and most of DKPs were derived from casein.

cyclic dipeptide, diketopiperazine, cheese

発表責任者：島村智子（tomokos@kochi-u.ac.jp）

講演番号：2E05-16
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 11:00～ ミーティングルーム E

低酸性条件下でのコーヒーの殺菌活性ならびに焙煎が活性に及ぼす影響

Bactericidal activity of coffee and effect of roasting on the activity

○井上 葵[1]、五十嵐 朱里[1]、筒浦 さとみ[2]、村田 容常[1] ([1]お茶の水女子大学、[2]新潟大学)
○Aoi INOUE[1], Juri IGARASHI[1], Satomi TSUTSUURA[2], Masatsune MURATA[1] ([1]Ochanomizu Univ., [2]Niigata Univ.)

【背景・目的】ソリュブルコーヒーは *Salmonella* spp. や*Escherichia coli* に対して低 pH で殺菌作用を示す。[1)] また、コーヒーに含まれるクロロゲン酸類も殺菌活性を示したが、コーヒー全体の 1 割程度しか説明できなかった。本研究では何がコーヒーの殺菌活性に寄与しているのかを調べるため、各種市販コーヒーの殺菌活性とクロロゲン酸類との関係を調べた後、ソリュブルコーヒーとコーヒー生豆の活性を比較し、また生豆を焙煎しその過程での殺菌活性を評価した。
【方法】殺菌活性の評価には、各試料を添加した後 pH 3.0 に調整した HI 培地に *Salmonella* spp. 2 株を添加したもの（10^6 CFU/mL）を用いた。1.5 時間後の生菌数を Δ3 log CFU/mL 減少させる活性を 1 U とした。クロロゲン酸類は、70%メタノールで抽出後酢酸エチルに転溶させ、HPLC で 5-CQA 換算で定量した。市販 6 種のソリュブルコーヒーの殺菌活性とクロロゲン酸量を測定した。また、粉砕した生豆とソリュブルコーヒーをエーテル、メタノールで洗浄後、80%メタノールで抽出した。メタノールを留去後酸性にし、酢酸エチルで抽出した（酢酸エチル画分）。200℃で 0-60 分間加熱した生豆を粉砕後、熱水抽出した。
【結果及び考察】市販 6 種のソリュブルコーヒーはいずれも同程度の比殺菌活性を示した。比殺菌活性とクロロゲン酸量の間に相関は認められなかった。コーヒーの酢酸エチル画分の比殺菌活性は生豆の比活性より高く、焙煎により活性が上昇することが示唆された。一方、生豆の活性はクロロゲン酸類によるものと推測された。生豆を 20 分間焙煎したときに殺菌活性は生豆の約 4 倍上昇し、その後は減少した。この結果より、焙煎が殺菌活性に影響することが示唆された。

1）Ueno *et al.*, *Food Sci. Technol. Res.*, **26**, 247 (2020).

A soluble coffee and chlorogenic acid derivatives showed bactericidal activity against *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* under low pH conditions. But the activity of coffee could not be explained only by the activities of chlorogenic acid derivatives, while the activty of green bean could be done. During roasting green bean, the activity was raised and then decreased. These results suggested that the roasting gave a crucial effect on the bactericidal activity of coffee.

coffee, chlorogenic acid, bactericidal activity

講演番号：2E05-17
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 11:00～ ミーティングルーム E

北海道で製造されたドライ熟成肉における真菌類の分布と香りに与える影響
Dry-aged beef manufactured in Japan: microbiota identification and their effects on volatile aroma compounds

○三上 奈々[1]、豊留 孝仁[2,3,4]、田村 健一[5]、山代 佳孝[1]、須合 胡夕紀[1]、吉冨 琴音[1]、高谷 政宏[6]、韓 圭鎬[1]、福島 道広[1]、島田 謙一郎[1]([1]帯畜大・畜産、[2]帯畜大・獣医、[3]帯畜大・動物・食品検査診断センター、[4]千葉大・真菌医学研究センター、[5]北一ミート（株)、[6]とかち財団)
○Nana MIKAMI[1], Takahito Toyotome[2,3,4], Kenichi Tamura[5], Yoshitaka Yamashiro[1], Koyuki Sugo[1], Kotone Yoshitomi[1], Masahiro Takaya[6], Kyu-Ho Han[1], Michihiro Fukushima[1], Kenichiro Shimada[1] ([1]Obihiro Univ, Agri., [2]Obihiro Univ. Vet. Med., [3]Diagnostic Center for Animal Health and Food Safety,Obihiro Univ. Agri. Vet. Med., [4]Medical Mycology Research Center, Chiba Univ., [5]Kitaichi Meat Co., Ltd, [6]Tokachi Foundation)

【背景・目的】ドライ熟成肉（Dry-aged beef：DAB）は、温度・湿度を一定に保った低温熟成庫内で肉表面に風を当て数週間貯蔵した牛肉である。肉自身が持つ酵素に加え、乾燥した肉の表面（クラスト）に生育する真菌類の酵素によってもタンパク質や脂質が分解され、それらの代謝物が独特の熟成香や味わいをもたらすと考えられている。しかし、真菌の種類や肉に対する作用を詳細に調べた報告はほとんどない。そのため、本研究では北海道で熟成された DAB に分布する微生物、特に真菌類に注目し、香りに与える影響を明らかにすることを目的とした。
【方法】ホルスタイン去勢牛の左右のランプをそれぞれドライ熟成、ウェット熟成（真空包装の状態）に供し、熟成庫（温度 2.9℃、湿度 90%）で 35 日間貯蔵した。DAB のクラストに生育した真菌の種類を DNA シーケンスにより同定し、細菌類の菌数を測定した。また、真菌が分布していないウェット熟成肉（WAB）と DAB の香気成分を GC-MS 分析によって比較した。
【結果】熟成期間を経て DAB に形成されたクラストには真菌類の生育が認められ、主要なものとして 3 種類の真菌 *Mucor flavus*、*Helicostylum pulchrum*、*Penicillium* 属を単離・同定した。一方、DAB 内部の乳酸菌や大腸菌群の菌数は WAB と比較し有意に抑制された。また、DAB の香気成分においては、マッシュルーム様（1-Octen-3-ol)、ナッツ様(1-Hexanol)の芳香化合物の産生が著しく多かった。これらの知見から、3 種類の真菌の存在が DAB の香りの形成に強く影響することが示唆された。

We aimed to determine mold, yeast, and bacteria distributions in dry-aged beef (DAB) manufactured in Hokkaido, Japan, and to study their effects on volatile aroma compounds by comparing to wet-aged beef (WAB). Two rump blocks from Holstein steer were dry- and wet-aged for 35 days at 2.9 °C and 90% RH. The psychrophilic molds *Mucor flavus* and *Helicostylum pulchrum* and other fungi (*Penicillium* sp. and *Debaryomyces* sp.) appeared on the crust of DAB, while lactic acid bacteria and coliforms were suppressed in its inner part. Dry-aging suppressed acids while increasing the production of various aroma compounds with mushroom-like, nutty, and other pleasant flavors. In this study, we identified major molds on DAB, which might contribute to an increase in aroma.

dry-aged beef, fungi, volatile aroma compounds

発表責任者：三上　奈々（nanam@obihiro.ac.jp）

講演番号：2E06-01
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 13:00～ ミーティングルーム E

環状四糖（CNN）水あめの調製法の検討

Study of preparation method of cyclic nigerosylnigerose (CNN) starch syrup

○安田 亜希子、宮田 学、山本 拓生、阿賀 創、山本 晃隆（株式会社 林原）
○Akiko YASUDA, Manabu MIYATA, Takuo YAMAMOTO, Hajime AGA, Koryu YAMAMOTO (Hayashibara Co., Ltd.)

【目的】環状四糖（cyclic nigerosylnigerose、CNN）は、低分子の食物繊維であり生理機能だけでなく物性もユニークな特性が期待されている。我々は、*Bacillus globisporus* 由来の酵素（6-α-glucosyltransferase および 3-α-isomaltosyltransferase）と cyclodextrin glucanotransferase（CGTase）を併用して、効率よく澱粉から CNN を生成できることを報告[1]している。近年、食品原料の製造においても SDGs 達成に向けた取り組みが求められている。酵素法による水あめの製法は、反応条件がマイルドなだけでなく廃棄物がほとんど出ない環境的にやさしい方法である。本研究では、*B. globisporus* 由来の酵素と CGTase にさらに種々の澱粉分解酵素を組み合わせることで、食品応用しやすい CNN 水あめの調製法を検討した。

【方法】30 w/w% 澱粉部分分解物に *B. globisporus* 由来の酵素および CGTase を pH 6.0・50℃で作用させた。分解酵素（isoamylase、pullulanase、glucoamylase、α-amylase）は、①反応 5 時間に分解酵素を添加後、反応 48 時間に反応を停止する方法と、②反応 48 時間に反応を停止した後に、分解酵素を添加して 50℃で 20 時間作用させる方法で添加した。得られた反応液は、精製・濃縮し、食物繊維含量の指標となる難消化性糖質含量、糖組成、粘度などの分析に供した。

【結果および考察】各水あめ中の難消化性糖質含量は、分解酵素を添加の有無で明らかな差はなく 70～80%程度であった。単糖・二糖の糖組成ができるだけ少なく粘度が低い水あめが調製できたのは、isoamylase あるいは pullulanase を①の方法で添加した条件であった。これらの方法で調製した CNN 水あめは、①食物繊維含量が高いこと、②単糖・二糖の糖組成が低くて着色しにくいこと、③粘度が低くて取り扱いやすいことから、食品応用のしやすさが期待された。

CNN is a low-molecular-weight dietary fiber and is expected to have unique properties not only in physiological functions but also in physical properties. In this study, we investigated the sustainable method of preparing CNN starch syrup by combining two enzymes of *B. globisporus* and CGTase with isoamylase or pullulanase. The CNN starch syrup contained 70-80% of indigestible sugar, had a low viscosity, and had a low composition of monosaccharide and disaccharide. The CNN starch syrup is expected to be a highly practical starch syrup because it not only contains a high dietary fiber but also is difficult to color and has good workability.

1) H. Aga *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **95**, 215-224 (2003).

cyclic nigerosylnigerose, amylase, SDGs

発表責任者：安田亜希子（akiko.yasuda@hb.nagase.co.jp）

講演番号：2E06-02
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 13:00～ ミーティングルーム E

環状四糖（CNN）水あめの工業スケールでの調製とその構造および基礎物性

Industrial preparation and structure-properties of cyclic nigerosylnigerose (CNN) starch syrup

○川内 優輝、安田 亜希子、宮田 学、国吉 三枝子、大河内 歩、佐能 吏、吉田 憲史、山本 拓生、阿賀 創、山本 晃隆（株式会社 林原）
○YUKI KAWAUCHI, AKIKO YASUDA, MANABU MIYATA, MIEKO KUNIYOSHI, AYUMI OKOCHI, OSAMU SANO, KENSHI YOSHIDA, TAKUO YAMAMOTO, HAJIME AGA, KORYU YAMAMOTO (Hayashibara Co., Ltd.)

【目的】前演題では、*Bacillus globisporus* 由来の酵素（6-α-glucosyltransferase および 3-α-isomaltosyltransferase）と cyclodextrin glucanotransferase（CGTase）にさらに isoamylase あるいは pullulanase を組み合わせることによる、食物繊維含量が高く低粘度で着色しにくい環状四糖（cyclic nigerosylnigerose、CNN）水あめの製法を示した。本研究では、CNN 水あめを工業スケールで調製し、得られた水あめ成分の構造および基礎物性を評価することを目的とした。
【方法】30 w/w% 液化澱粉に *B. globisporus* 由来の酵素、CGTase および isoamylase を 50℃で 48 時間作用させた。反応停止後、精製・濃縮した。得られた CNN 水あめは、糖組成、総 CNN 量、食物繊維含量、結合様式、還元糖量（DE）、分子量分布、粘度、水分活性など種々の分析に供し、市販の四糖水あめと比較した。なお、総 CNN 量は、水あめ中の CNN 構造以外の糖を glucoamylase とα-glucosidase により消化した後の CNN の糖組成から算出した。
【結果および考察】得られた水あめは、主成分の CNN 含量が 33%、総 CNN 量が 47%で、食物繊維含量は 76%であった。単糖の含量は 5%で、DE は 14 であった。結合様式は、α-1,6 結合とα-1,3 結合がそれぞれ 30%程度を占め、澱粉由来のα-1,4 結合は 10%程度に減少した。重量平均分子量は約 800 Da で食物繊維素材としては低分子であった。粘度は、市販の四糖水あめであるテトラップ®（株式会社 林原、主成分：maltotetraose）と同等であった。水分活性（Aw）は、酵母が増殖しないとされている 0.88 を下回る値であった。以上のことから、CNN 水あめは市販の水あめと同等の取り扱い易さで、長期保存ができることが示唆された。また、既存の食物繊維素材とは結合様式や分子量が異なるため、新しい味質や物性の食品を提供できる可能性が期待された。

CNN starch syrup was prepared using two enzymes of *B. globisporus*, CGTase and isoamylase. This starch syrup had a dietary fiber content of 76%, a low monosaccharide composition and a low dextrose equivalent. The viscosity of CNN starch syrup is equivalent to that of commercially available tetrasaccharide starch syrup. In addition, the glucose binding mode of this syrup contained only about 10% of α-1,4 glucosidic bonds derived from starch, and the weight average molecular weight was 800 Da, that was smaller than that of other commercial dietary fibers. CNN starch syrup may be possible to provide unique characteristics such as different tastes and physical properties from existing other commercial dietary fibers.

cyclic nigerosylnigerose, bacillus, isoamylase

発表責任者：川内 優輝（yuki.kawauchi@hb.nagase.co.jp）

講演番号：2E06-03
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 13:00～ ミーティングルーム E

環状四糖（CNN）水あめの諸性質と下痢に対する最大無作用量

Properties of cyclic nigerosylnigerose (CNN) starch syrup and its no-observed-adverse effect level for diarrhea

○櫻井 岳夫、安田 亜希子、黒瀬 真弓、小川 亨、定清 剛、国吉 三枝子、大河内 歩、佐能 吏、吉田 憲史、山本 拓生、遠藤 伸、阿賀 創、三皷 仁志、山本 晃隆（株式会社 林原）
○Takeo SAKURAI, Akiko YASUDA, Mayumi KUROSE, Toru OGAWA, Tsuyoshi SADAKIYO, Mieko KUNIYOSHI, Ayumi OKOCHI, Osamu SANO, Kenshi YOSHIDA, Takuo YAMAMOTO, Shin ENDO, Hajime AGA, Hitoshi MITSUZUMI, Koryu YAMAMOTO (Hayashibara Co., Ltd.)

【目的】前演題では、環状四糖（cyclic nigerosylnigerose、CNN）水あめは、工業スケールで調製できることが確認された。また、CNN 水あめを構成する糖質の結合様式は α-1,4 結合が 10%程度と少なく、食物繊維としては重量平均分子量が小さいことから、既存の食物繊維素材とは味質や物性の異なる食品を提供できる可能性が期待された。そのため本研究では、CNN 水あめの諸性質および下痢に対する最大無作用量を評価することを目的とした。
【方法】前報で調製した CNN 水あめについて、原体の保存安定性（40 ℃、RH75%）、10 w/w%水溶液の加熱安定性（100 ℃、60 min）、メイラード反応性などについて評価した。甘味度および味質は、選抜パネルを用いて評価した。下痢に対する最大無作用量は、被験者 20 名に対し、CNN 水あめ（固形分 25～70 g）摂取後 24 時間以内の排便状況をアンケート調査することにより求めた。
【結果および考察】CNN 水あめ原体を 3 か月保存した結果、食物繊維含量（76%）および総 CNN 量（47%）は安定であり、単糖（5%）の増加も見られなかった。また、粘度や水分活性に明らかな変化はなく、大腸菌群・真菌・生菌は検出されず、重金属・ヒ素も検出されなかった。pH 3～7 の 10 w/w%水溶液は加熱により、pH 7 のみわずかに着色したが（$Abs_{480\,nm}$：<0.1）、食物繊維含量の指標となる難消化性糖質含量と還元糖量に変化はなかった。pH 4～7 におけるメイラード反応性は、アミノ酸とタンパク質のどちらでも、pH が高いほど着色しやすかった。CNN 水あめの甘味度は 25%で、程よい甘味を有することは、食物繊維素材としては特徴的であると考えられた。3 点識別試験では、味質は砂糖と有意に異なった。下痢に対する最大無作用量は、0.88 g/kg−体重であった。そのため、CNN 水あめは一般的な食物繊維と同様、幅広い食品に安全に配合できると考えられた。

The CNN starch syrup had high storage stability, and its dietary fiber content was stable even in an aqueous solution over a wide pH range. In addition, the Maillard reaction of this syrup proceeded in the neutral pH range. The degree of sweetness of CNN starch syrup was 25%, which was high as a dietary fiber material, and it was characteristic that it had a moderate sweetness. The NOAEL for diarrhea was 0.88 g/kg, and it was suggested that CNN starch syrup can be safely blended in various foods like general dietary fibers.

cyclic nigerosylnigerose, dietary fiber, no-observed-adverse effect level for diarrhea

発表責任者：櫻井岳夫（takeo.sakurai@hb.nagase.co.jp）

講演番号：2E06-04
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 13:00～ ミーティングルーム E

リノール酸ヒドロペルオキシド異性体から生じる酸化二次生成物の解析

Analysis of secondary oxidation products derived from linoleic acid hydroperoxide isomers

○宮崎 瑠璃子[1]、加藤 俊治[2]、境野 眞善[1,3]、竹内 茂雄[3]、今義 潤[2,3]、仲川 清隆[1,2]([1]東北大院農・機能分子解析学、[2]東北大院農・J-オイルミルズ油脂イノベーション共同研究講座、[3](株)J-オイルミルズ)

○RURIKO MIYAZAKI[1], SYUNJI KATO[2], MASAYOSHI SAKAINO[1,3], SHIGEO TAKEUCHI[3], JUN IMAGI[2,3], KIYOTAKA NAKAGAWA[1,2] ([1]Food and Biodynamic Chemistry Laboratory, Tohoku Univ., [2]J-Oil Mills Innovation Laboratory, Tohoku Univ., [3]J-OIL MILLS, INC.)

【背景】食品脂質の酸化では、酸化一次生成物である脂質ヒドロペルオキシド（LOOH）が生じ、次いでアルデヒドやケトンといった多種多様な酸化二次生成物が生成し、食品の品質に深く関わる。一部の脂質酸化物は、食品に好ましい風味を付与するとも言われている。但し、LOOH には様々なヒドロペルオキシ基位置異性体が存在し、これらの分解機構は複雑であるため、種々の酸化二次生成物がどのような経路を経て生成されているのかについては未だ不明な点が多い。これまで当研究室では、様々なヒドロペルオキシ基位置異性体（例えば、リノール酸からの 4 種のヒドロペルオキシ基位置異性体（HpODE））の標準品調製と分析方法の確立を行ってきた。本法は、それぞれのヒドロペルオキシ基位置異性体から生じる酸化二次生成物の解析にも有効であると考えられる。そこで本研究では、特に加熱酸化によって生成する 2 種の HpODE（9-HpODE および 13-HpODE）に着目し、これらからどのような酸化二次生成物がどのような機序で生成するのかを解析した。

【方法】先に構築した方法で、9-HpODE と 13-HpODE を調製した。これらの標準品を加熱分解した後、酸化二次生成物を HPLC-MS および GC-MS を用いて解析した。

【結果と考察】9-HpODE や 13-HpODE のヒドロペルオキシ基のアルコキシラジカルへの分解を起点として、アルデヒドやヒドロキシ、ケトンと考えられる酸化二次生成物の生成が確認された。また、このアルコキシラジカルの近傍のπ結合への作用によってできたエポキシを有する種々の酸化二次生成物が検出された。興味深いことに 9-HpODE および 13-HpODE の分解からは類似した酸化二次生成物プロファイルが得られることがわかった。これは 9-HpODE および 13-HpODE が可逆的に異性化するためと考えられた。今後は、他の HpODE 異性体、さらには主要な食品脂質であるトリアシルグリセロールの酸化分解経路の解明を進めていく。こうした酸化二次生成物の構造と生成経路を明らかにすることにより、食品中の脂質酸化の品質や風味に与える影響がより明確になると期待される。

Lipid oxidation products have been known to be responsible for the deterioration of foods, but recent studies have revealed that they also contribute to pleasant flavor. However, the mechanisms by which such lipid oxidation products are generated remains unclear. In this study, we prepared standards of linoleic acid hydroperoxide isomers that are generated by thermal oxidation (9- and 13-HpODE). When the prepared standards were thermally decomposed and analyzed by HPLC-MS and GC-MS, various secondary oxidation products (e.g. aldehydes, hydroxides, and ketones) generated via alkoxyl radical formation were detected.

secondary oxidation products, lipid oxidation, mass spectrometry

発表責任者：宮崎　瑠璃子（miyazaki.ruriko.s1@dc.tohoku.ac.jp）

講演番号：2E06-05
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 13:00～ ミーティングルーム E

イオンモビリティー質量分析を用いた酵素による脂質過酸化の評価

Evaluation of enzymatic lipid peroxidation using Ion mobility mass spectrometry

○伊藤 隼哉[1]、清水 直紀[1]、加藤 俊治[1]、花田 篤志[2]、前川 正充[3]、仲川 清隆[1]（[1]東北大院農・機能分子解析学、[2]株式会社エービー・サイエックス、[3]東北大病薬）
○Junya ITO[1], Naoki SHIMIZU[1], Shunji KATO[1], Atsushi HANADA[2], Masamitsu MAEKAWA[3], Kiyotaka NAKAGAWA[1] ([1]Food and Biodynamic Chemistry Laboratory, Tohoku Univ., [2]K.K. AB SCIEX, [3]Department of Pharmaceutical Sciences, Tohoku Univ. Hosp.)

【背景】生体や植物体の脂質の酸化は、生理的に重要な初期反応として知られている。脂質の酸化酵素の一つであるリポキシゲナーゼ（LOX）は、動脈硬化症などの脂質酸化関連疾患、植物ホルモンの生合成など、重要な脂質酸化に関与するため、その評価が重要視されてきた。LOX は立体（*RS*、*cis-trans*）選択的に脂質酸化を誘導することから、過酸化脂質の詳細な異性体解析により LOX 酸化評価が可能であると考えられる。本研究では、イオンモビリティー質量分析計（IMMS）を用い、過酸化脂質の立体・*cis-trans* 異性体の解析方法を構築し、種々の酸化種（ラジカル、LOX、一重項酸素）の中で、ヒト血中における LOX 酸化の関与を評価しようとした。
【方法】生体と植物体における主要なリン脂質であるホスファチジルコリン（16:0/18:2 PC）を LOX 酸化のターゲット分子とした。リノール酸をラジカル酸化させ 13(*RS*)-hydroperoxy-9*Z*,11*E*-octadecadienoic acid（13(*RS*)-*ZE*-HPODE）と 13-*EE*-HPODE を単離し、1-palmitoyl-2-hydroxy-*sn*-glycero-3-phosphocholine（16:0 Lyso PC）とのエステル縮合により、*cis-trans* 型 PC ヒドロペルオキシド（PCOOH（*ZE*（*RS*）-PCOOH））と *trans-trans* 型 PCOOH（*EE*-PCOOH）を調製した。さらに、16:0/18:2 PC を LOX で処理し、酵素酸化物である *ZE*（*S*）-PCOOH を調製した。これらの標品と質量分析器（QTRAP 6500（SCIEX））を用いて、LC-IMMS の分析条件を検討した。
【結果・考察】Modifier としてアセトニトリルと 1–プロパノールを使用することで、*EE*-PCOOH、*ZE*-PCOOH の *cis-trans* 異性体を分離できた。さらに、*ZE*-PCOOH に関しては、*ZE*（*S*）-PCOOH と *ZE*（*R*）-PCOOH の立体異性体分離も同時に達成した。本条件をもとに LC-IMMS の分析条件を最適化することで、通常の C18 カラムで PCOOH の立体・*cis-trans* 異性体解析を可能とした。本法で健常者（n=8）の血漿を解析すると、健常者では LOX 酸化による酸化が優位に進行しているのではなく、主にラジカル酸化によって PCOOH が生じていることが示唆され、酸化物の構造解析に基づいた酸化機構の評価を達成できた。今後に、臨床サンプルや食品を含めた植物体など、種々のサンプルの解析を通じて、生体・植物体や食品における LOX 酸化の役割をより明確にできると期待される。

An LC-ion mobility mass spectrometry (IMMS) method for the simultaneous separation of the stereoisomers and cis-trans isomers of phospholipid peroxides was developed. By analyzing stereoisomers and cis-trans isomers, the method can evaluate the involvement of enzymes during lipid peroxidation. Using the developed LC-IMMS method, the plasma of healthy subjects was analyzed, and it was shown that oxidation by radicals rather than enzymes is the main oxidation mechanism in healthy subjects.

lipid oxidation, lipoxygenase, LC-MS/MS

発表責任者：伊藤隼哉（junyai@tohoku.ac.jp）

講演番号：2E06-06
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 13:00～ ミーティングルーム E

米糠アルブミンの効率的な抽出法の確立とその食後血糖値上昇抑制作用の検討

Establishment of an efficient extraction method for rice-bran albumin and examination of its suppressive effect on postprandial blood glucose elevation

○小川 里桜[1]、杉本 千晶[2]、小谷 純[2]、稲 成信[2]、二宮 和美[1]、山口 勇将[2]、熊谷 仁[1]、熊谷 日登美[2] ([1]共立女子、[2]日大・生資科)
○OGAWA Rio[1], SUGIMOTO Chiaki[2], KOTANI Sunao[2], INA Shigenobu[2], NINOMIYA Kazumi[1], YAMAGUCHI Yusuke[2], KUMAGAI Hitoshi[1], KUMAGAI Hitomi[2] ([1]Kyoritsu Women's University, [2]Nihon University)

糖尿病の患者数は世界的に増大しており、この予防が重要であるとされている。糖尿病の予防には、食後の血糖値上昇を穏やかにする食品の摂取が有効とされている。我々は、先行研究において、米胚乳アルブミン(REA)が、消化耐性を有し、食物繊維様にグルコースを吸着することで食後の血糖値上昇を穏やかすること、および *in vitro* において、米糠アルブミン(RBA)も REA と同様にグルコース吸着能を有することを明らかにしている。しかし、RBA は、米糠中のデンプンや食物繊維等の存在により、抽出効率が悪いことが問題となっている。また、RBA が *in vivo* において、血糖値上昇抑制作用を示すかは不明である。そこで本研究では、酵素を用いた RBA の抽出効率向上および *in vivo* における米糠の食後血糖値上昇抑制作用について検討した。RBA は、緩衝液中でヘミセルラーゼを反応させた後、各種糖化酵素やプロテアーゼを作用させることにより抽出した。酵素分解液を遠心分離し、得られた上清中の還元糖量およびタンパク質量を、Somogyi-Nelson 法およびビシンコニン酸法により測定した。次に、*in vivo* における血糖値上昇抑制作用の評価を行った。ラットにデンプンと共に RBA を経口胃内投与した後、経時的に尾静脈採血を行い、血糖値を測定した。その結果、糖化酵素によるデンプンや食物繊維の分解およびトリプシン処理による夾雑タンパク質の分解が、米糠中のタンパク質の効率的な抽出に有効であることが示された。また、*in vivo* において、RBA は、REA と同等に食後血糖値の上昇を遅延させた。

Patients suffering from diabetes mellitus has been increasing worldwide and its prevention is regarded to be important. For prevention of diabetes mellitus, it is effective to control postprandial blood glucose level. We have already shown that indigestible rice-endosperm albumin (REA) suppresses the elevation of postprandial blood glucose level by adsorbing it like dietary fiber and rice-bran albumin (RBA) has glucose-adsorption capacity to the same level as REA *in vitro*. However, there still remains a problem on poor extraction efficiency of RBA due to the interaction with polysaccharides such as starch and dietary fiber. In addition, suppressive effect of RBA on postprandial hyperglycaemia *in vivo* has not been examined yet. Therefore, in this study, we examined the improvement of extraction efficiency of RBA using enzymes and the suppressive effect of RBA on postprandial blood-glucose elevation *in vivo*. As a result, the enzymatic hydrolysis of polysaccharides and digestible proteins are found to be effective for efficient extraction of RBA. Furthermore, similar to REA, RBA delayed the elevation of postprandial blood glucose level *in vivo*.

rice bran albumin, extraction method using polysaccharide-degrading enzymes, suppresses the elevation of postprandial blood glucose

講演番号：2E06-07
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 13:00～ ミーティングルーム E

オリーブ抽出物によるカキアレルゲンタンパク質の低アレルゲン化

Chemical modification of oyster allergen by using olive extract

○菰田 俊一、山口 春菜、赤澤 隆志（宮城大 食産業）
○Toshikazu Komoda, Haruna Yamaguchi, Takashi Akazawa (MIYAGI Univ.)

［背景と目的］
カキの主要なアレルゲンタンパク質とオリーブ葉由来のポリフェノールを反応させることで、アレルゲン性の低減化を試みた。近年、ポリフェノールを用いたタンパク質の化学修飾の報告が増えている。本研究では、ポリフェノールを豊富に含むオリーブ葉の抽出物を利用して、タンパク質の化学修飾を試み、低アレルゲン化カキタンパク質を作成することとした。
［方法］
カキアレルゲンタンパク質とオリーブ葉ポリフェノール抽出物の混合液は、80℃で加熱することにより反応させた。反応の様子は SDS-PAGE で確認し、反応物のアレルゲン性は、ウエスタンブロット法とドットブロット法により評価した。現在モデルマウスを用いて、アレルゲン性の評価を行っている。
［結果と考察］
SDS-PAGE により反応の様子を確認したところ、オリーブ葉ポリフェノールとの反応で、カキアレルゲンタンパク質は重合体化し、様々な分子量の重合体を形成していることが示された。反応物の抗体反応性試験の結果、カキアレルゲン認識抗体の認識能が低下することが示された。

[Background]
We applied olive polyphenol on the chemical modification for suppressing the oyster allergy. Olive has unique polyphenols which can bind against various protein to improve the protein function. Then, we used olive leaf polyphenol extract for the chemical modification of oyster allergen protein.
[Method]
The oyster allergen and the olive polyphenol extract were reacted on heat condition. The reactant was assessed by using SDS-PAGE, western blotting, and dot blotting method.
[Result and Discussion]
We observed that the oyster allergen protein was modified by the olive polyphenol to form several modified proteins depending on reaction time. Moreover, these modified proteins showed the suppressive effect against the anti-oyster allergen antibody recognition.

oyster allergen, olive extract

発表責任者：菰田俊一（komoda@myu.ac.jp）

講演番号：2E06-08
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 13:00～ ミーティングルーム E

アゴニスト構造を元に見出したヒト苦味・甘味受容体共阻害ペプチド
Trp-Trp is a novel antagonist for bitter and sweet taste receptors

○尾城 一恵[1]、西尾 洋美[1]、伊藤 豊実[1]、豊原 良和[2]、平本 忠浩[2]、寺田 祐子[1]、伊藤 圭祐[1]([1]静県大院・薬食、[2]高砂香料工業)
○Ichie OJIRO[1], Hiromi NISHIO[1], Toyomi ITO[1], Yoshikazu TOYOHARA[2], Tadahiro HIRAMOTO[2], Yuko TERADA[1], Keisuke ITO[1] ([1]Univ. Shizuoka, [2]Takasago International Corporation)

【背景・目的】ポリフェノールに代表される食品機能性成分の多くは、ヒトにとって好ましくない苦味を呈する。苦味マスキング成分の利用は食品機能性成分の摂取をサポートし、食品成分の健康効果の発現につながることが期待できるが、現在のところ、ポリフェノールの苦味を味覚受容体レベルで効果的に阻害できる苦味マスキング成分はほとんど報告されていない。そこで本研究では、新たな苦味マスキング成分の取得を目指し、ポリフェノールを含めた最も多くのアゴニストが報告されている苦味受容体 hTAS2R14 を標的として、アンタゴニストの開発を進めた。

【結果・考察】アゴニストの構造類似体にはアンタゴニストが存在すると仮説を立て、hTAS2R14 のアゴニストであるペプチド（Trp-Trp-Trp）の構造を基に、類似ペプチドからカルシウムイメージング法により hTAS2R14 応答抑制成分を探索した。その結果、新規 hTAS2R14 アンタゴニストとして Trp-Trp を見出した。Trp-Trp は競合型（高濃度では混合型）の阻害様式を示したことから、hTAS2R14 のアゴニスト結合ポケットに作用することが示唆された。Trp-Trp は解析した全ての hTAS2R14 アゴニスト（Tangeretin、Aristolochic acid、Flufenamic acid、(-) Epicatechin gallate）による応答を濃度依存的に抑制し、また、hTAS2R14 と共通のアゴニストが報告されている hTAS2R16、hTAS2R43、hTAS2R46 のアゴニスト（Tangeretin、Aristolochic acid、Salicin）応答に対しても抑制作用を示した。一方、hTAS2R39 応答に対してはわずかな相加作用を示した。Trp-Trp は D-Trp をアゴニストとする甘味受容体（hT1R2/hT1R3）に対しても、全てのアゴニスト（Aspartame、D-Trp、Cyclamate、Rebaudioside A）による応答を抑制した。以上の結果から、苦味受容体である hTAS2R14、hTAS2R16、hTAS2R43、hTAS2R46 と、甘味受容体である hT1R2/hT1R3 の応答を同時に抑制する多機能型マスキングペプチドとして Trp-Trp を発見した。

Most of the functional food components, such as polyphenol, elicit bitterness that is aversive taste for human. In this study, antagonist for a bitter taste receptor hTAS2R14 which has greatest number of agonists was developed for effective bitter taste masking. Trp-Trp derived from Trp-Trp-Trp, a hTAS2R14 agonist, was found to act as an antagonist not only for hTAS2R14 but also for other bitter taste receptors hTAS2R16, hTAS2R43 and hTAS2R46. Interestingly, Trp-Trp also inhibited activation of hT1R2/T1R3, a sweet taste receptor.

bitter taste, masking, peptide

発表責任者：伊藤圭祐（sukeito@u-shizuoka-ken.ac.jp）

講演番号：2E06-09
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 13:00～ ミーティングルーム E

抗腫瘍性ルナシンの生成に関わる大豆成分の同定と生成機構の解明

Identification of converting factors for anti-cancer peptide lunasin from soybean isolated and their mechanism

○小川 智久[1,2]、大泉 結帆[2]、平垣内 一子[2]、田中 良和[2]、村本 光二[2]（[1]東北大院農、[2]東北大院生命）
○Tomohisa Ogawa[1,2], Yuho Ohizumi[2], Ichiko Hirakakiuchi[2], Yoshikazu Tanaka[2], Koji Muramoto[2]
([1]Grad.Sch.of Agric.Sci., Tohoku Univ., [2]Grad.Sch.of Life Sci., Tohoku Univ.)

【目的】大豆由来のルナシンは２S アルブミンの短鎖サブユニットにあたり，その C 末端に RGD 配列と８残基ポリアスパラギン酸モチーフを持ち，抗腫瘍活性や抗炎症作用が報告されている。我々は，特異的抗体を用いて大豆および大豆加工食品中のルナシンの動態を明らかにしてきた。その結果，生大豆中に遊離ルナシンは存在せず，低脂肪豆乳など大豆加熱加工食品に存在することを明らかにした。しかし，ルナシンが２S アルブミンからどのように生成するか，その機構は不明である。本研究は２S アルブミンからルナシンへの変換に関わる因子の探索とルナシン生成機構の解明を目的とした。
【方法・結果】ルナシンの生成は，特異的抗体を用いた Western blot と ELISA 法，逆相 HPLC により解析した。その結果，精製２S アルブミンを加熱してもルナシンは生じず，大豆抽出物の加熱処理では生じたことから，大豆抽出物中にルナシンを遊離する因子の存在が示唆された。そこでルナシンへの変換に関わる因子を明らかにするため，まずプロテインジスルフィドイソメラーゼとチオレドキシン様酵素によるルナシン生成への影響を調べた結果，24 時間でルナシンの生成が見られたものの加熱処理に見られた短時間での生成はなかった。次に，ビオチン化 2S アルブミンを用いた大豆抽出タンパク質と加熱処理し，S-S 交換反応中間体を同定しルナシンへの変換に関わる新規因子を探索した。その結果，生大豆ホモジネート中に２S アルブミンと S-S 交換反応により生成したバンドが見られ，アビジン固定樹脂による精製と MALDI-Tof タンデム質量分析による解析を行い，2 種のタンパク質 Ser/Thr プロテインキナーゼ OXI1 と 3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase II を同定した。
【考察】2S アルブミンから大豆加工食品におけるルナシンの生成に関与するタンパク質を明らかにした。この生成機構をもとにルナシン高含有大豆食品などの開発に応用できることが期待される。

The soybean peptide lunasin, which is small subunit of 2S albumin, is known to have anti-cancer and anti-inflammatory effects. Previously, we found the abundant lunasin contents in the soybean-products such as low-fat soymilk although lunasin is hardly found in raw soybean. However, it is still unclear how lunasin is produced from 2S albumin during food processing. In this study, we analyzed the lunasin-converting mechanism from 2S albumin under processing conditions. Although lunasin could not be identified from purified 2S albumin with heat treating at 90˚C, its formation was observed from raw soybean isolate including 2S albumin under same conditions, indicating that some lunasin-converting mechanism and factors exist in soybean. To identify the S-S exchange reactive intermediates and lunasin-converting factors, we analyzed by using biothin-labeled 2S albumin and 2D-SDS-PAGE. Furthermore, we isolated intermediates by avidin-linked resin, and identified MALDI-Tof MS/MS analysis. As a result, some proteins including Ser/Thr protein kinase OXI1 and 3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase II were identified as a lunasin-converting factor.

lunasin, soybean, anti-cancer peptide

発表責任者：小川智久（tomohisa.ogawa.c3@tohoku.ac.jp）

講演番号：2E06-10
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 13:00～ ミーティングルーム E

加熱殺菌による起泡性低下要因の探索

Decreasing factors in egg white foaming capacity by pasteurization

○中根 和可奈[1,2]、小山 翔太[1,2]、辻井 良政[2,3]、高野 克己[3]、半田 明弘[2,4]（[1]東京農大院応生、[2]東京農大キユーピーエッグイノベーション、[3]東京農大応生農化、[4]キユーピー（株））
○WAKANA NAKANE[1,2], SHOTA KOYAMA[1,2], YOSHIMASA TSUJII[2,3], KATSUMI TAKANO[3], AKIHIRO HANDA[2,4] ([1]Grad. Sch. Appl. Biosci., Tokyo Univ. Agric., [2]Kewpie Res. Div. Egg Innov., Tokyo Univ. Agric., [3]Fac. Appl. Biosci., Tokyo Univ. Agric., [4]Kewpie Corp.)

卵白の起泡性は洋菓子製造などで広く利用される。産業上は、一般的に、安全性を担保するために加熱殺菌をした殺菌卵白製品が重用されている。しかし、殺菌卵白は生卵白に比べ起泡性が劣ることが課題となっているが、その原因は解明されていない。そこで本研究では、生卵白の加熱殺菌による起泡性低下の原因解明に取り組んだ。

生卵白および 56℃で 5 分間加熱殺菌した卵白を市販ミキサー（Kenmix chef XL PRO）にて撹拌し、起泡性を評価したところ、両者の硬さの最大値は同等であり、高さの最大値は殺菌により小さくなった。またピークに達するまでの時間は殺菌により遅延した。撹拌時間ごとに採取した泡から分画した水相画分と不溶性画分を電気泳動に供し、タンパク質の組成を確認した結果、両試料とも撹拌に伴いオボムチンおよびオボグロブリンが水相画分では減少し、不溶性画分では増加した。また、殺菌により不溶性画分の両タンパク質の割合は小さくなった。そこでオボムチンとオボグロブリンに着目し、これらのタンパク質を除去した卵白について、殺菌の有無で起泡性を評価したところ、いずれの試験においても殺菌による高さの低下および殺菌によるピークの遅延は生じなかった。

以上の結果から、起泡性の低下は殺菌によりオボムチンとオボグロブリンの気液界面への吸着が阻害されることにより生じていることが推察された。

Foaming properties of egg white are applied for producing confectionary products, where heat pasteurized liquid egg white is often used. However the pasteurization of liquid egg white deteriorates the foaming capacity. The purpose of this study is to elucidate the mechanism underlying the damage of the foaming properties by the pasteurization. The foaming properties were measured using Kenmix chef XL PRO (Aicohsha MFG. CO.) , and the results showed that the pasteurized (56°C, 5 min) egg white showed comparable maximum hardness and lower maximum volume compared to raw egg white, and reached to the peaks later. Gel electrophoresis revealed that ovomucin and ovoglobulin were transferred from the water phase to the unsoluble fraction along with foaming in both samples. The ratio of the proteins in unsoluble fraction was decreased by pasteurization. Furthermore, ovomucin and ovoglobulin-removed egg white had comparable foaming capacity with the pasteurization. These result indicated that interfacial adsorption of ovomucin and ovoglobulin were inhibited by the pasteurization, causing decrease in foaming capacity.

ovomucin, foaming, pasteurization

講演番号：2E06-11
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 13:00～ ミーティングルーム E

超高速 GC による醤油の香気特性評価と官能評価点数との相関

The correlation of ultra high speed GC analysis with sensory evaluation score of soy sauce

○白土 遥菜[1]、渡邉 聡美[1]、脇山 元気[2]、植木 達朗[2]、小林 弘司[1]、石川 洋哉[1]([1]福女大、[2]福岡醤油醸造組合)
○Haruna SHIRATSUCHI[1], Satomi WATANABE[1], Motoki WAKIYAMA[2], Tatsuro UEKI[2], Hiroshi KOBAYASHI[1], Hiroya ISHIKAWA[1] ([1]Fukuoka Women's Univ., [2]Fukuoka Shoyu Jyozo K.)

醤油において、香りはその品質を左右する重要な因子の一つである。醤油の香り分析は、これまで GC、GC-MS 分析による特徴香気成分の同定、定量により行われてきたが、特徴香気成分と官能評価との関連性については十分明らかにされていない。

本研究では、超高速 GC 及びにおい嗅ぎ GC-MS により、醤油製品の香気特性を明らかにするとともに、官能評価得点との関連性を検討し、特徴香気成分と官能評価結果との関連性を検討した。試料は本醸造醤油 31 本と混合醸造醤油 69 本、合計 100 本の醤油を用いた。九州地区しょうゆ JAS 唎味研究会で官能評価を行い、35 名の合計点数を官能評価得点として示した。

超高速 GC 分析の結果に基づき、主成分分析を行った結果、揮発性成分の構成が本醸造醤油に特徴的なもの、混合醸造醤油に特徴的なもの、両者が類似しているものに分かれて分布することが明らかとなった。続いて、本醸造醤油 16 本を対象として香りの官能評価点数と醤油香気成分の面積値との相関を検討した結果、2-phenylethyl alcohol 及び furfuryl alcohol において、これらの成分が多いほど官能的に高評価となる傾向が示唆された。一方で混合醸造（14 本）では、isovaleraldehyde が多いほど官能的に低評価となる傾向が示唆された。

The aroma of soy sauce (SS) is known to be one of the important factors that affect the quality of SS products. Many volatile compounds have been identified and quantified using ultra high speed GC analysis, but the relationship between key aroma compounds and sensory evaluation (SE) of the overall SS aroma remains unclear.

The objectives of this study were to clarify the characteristics of aroma profiles of SS, as well as to investigate relationship between the results of GC analysis and SE. 31 samples of *Honjozo* SS and 69 samples of *Kongo* SS were used for this investigation. SE was performed based on JAS's grading scale, and the total scores of 35 panelists were used.

The PCA based on the results of GC showed that the samples can be separated into 3 groups: *Kongo*, *Honjozo*, and both of *Kongo* and *Honjozo*. Furthermore, the correlation between the GC area of key aroma compounds in SS and the SE scores suggested that *Honjozo* samples with higher area of 2-phenylethyl alcohol and furfuryl alcohol are inclined to have higher sensory quality, while *Kongo* samples with higher area of isovaleraldehyde are likely to show lower sensory quality.

soy sauce, aroma analysis, ultra high speed GC

発表責任者：白土遥菜（17uf015@mb2.fwu.ac.jp）

講演番号：2E06-12
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 13:00～ ミーティングルーム E

緑藻類スジアオノリのβ－カロテン含有量と水温によるその変動

β-carotene content of the green alga Ulva prolifera and its fluctuation depending on the water temperature

○谷山 友規[1]、團 昭紀[2]、垣田 浩孝[1] ([1]日大院総合基、[2]徳島大学産業院)
○Tomoki TANIYAMA[1], Akinori DAN[2], Hirotaka KAKITA[1] ([1]Graduate School of Integrated Basic Sciences, Nihon Univ., [2]Industry-University R&D startup Leading Institute, Tokushima Univ.)

スジアオノリはカロテノイドを多く含む。海藻中の βーカロテン含有量は緑黄色野菜よりは少ないが淡色野菜よりは多い。海藻カロテノイドの中でも β-カロテンは、ビタミン A（レチノール）前駆体であるため注目を集めているカロテン類の一つである。ビタミン A は皮膚や粘膜の健康維持や夜間視力維持を助ける栄養素である。スジアオノリを原料とした製品にアオノリ粉がある。スジアオノリ以外にもアオサ（*U. pertusa*）、ヒトエグサ（*Monostroma nitidum*）、ウスバアオノリ（*U. linza*）等を原料とした粉もアオノリ粉という同じ名前で市販されている。そこでアオノリ粉原料である４種類の緑藻類について β-カロテン含有量を比較することを目的とした。培養温度のスジアオノリの β-カロテン含有量への影響解明も目的とした。酸化防止剤含有溶媒での抽出法と逆相 HPLC を組み合わせた分析により、スジアオノリがアオサやヒトエグサよりも βーカロテンを多く含有していることが明らかとなった。水温によるスジアオノリの成長とβ－カロテン含有量への影響は検討中である。

The green alga *Ulva prolifera* is rich in carotenoids. The β-carotene content in the seaweed is lower than that of green-yellow vegetables but higher than that of light-colored ones. Among the seaweed carotenoids, β-carotene is one of the carotenes that is attracting attention because it is a vitamin A (retinol) precursor. Vitamin A is a nutrient that helps maintain healthy skin and mucous membranes and maintain night vision. Green laver powder is a product made from *U. prolifera*. In addition to green laver, powders made from sea lettuce (*U. pertusa*), *monostroma nitidum*, usba aonori (*U. linza*), etc. are also commercially available under the same name as green laver powder. Therefore, the purpose of this study was to compare the β-carotene content of four types of green algae, which are raw materials for green laver flour. We also aimed to elucidate the effect of culture temperature on β-carotene content of *U. prolifera*. Analysis combining the extraction method with an antioxidant-containing solvent and reversed-phase HPLC showed that *U. prolofera* contained more β-carotene than other three kinds of green algae. The effects of water temperature on the growth of *U. prolifera* and β-carotene content are under investigation.

Water temperature, Seaweed, ß-carotene

発表責任者：垣田浩孝（kakita.hirotaka@nihon-u.ac.jp）

講演番号：2E06-13
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 13:00～ ミーティングルーム E

ゲル濾過高速液体クロマトグラフィーによるクチナシ青色素の分子量測定法の検討

Examination of molecular weight measurement method of the gardenia blue pigment by gel filtration high performance liquid chromatography

○米山 弥也子[1]、辻井 良政[2]、高野 克己[2] ([1]東京農大院・農化、[2]東京農大応生・農化)
○Yayako YONEYAMA[1], Yoshimasa TSUJII[2], Katsumi TAKANO[2] ([1]Tokyo University Graduate School of Agriculture, [2]Tokyo University of Agriculture)

クチナシ青色素とは天然系色素の 1 つであり、既存添加物として認可され様々な食品に使用されている。クチナシ果実から得られたゲニポシドとタンパク質加水分解物の混合物に β-グルコシターゼを添加して得られる化合物であり、ゲニピンとアミノ酸・ペプチドから成る高分子重合体だと考えられている。しかし、詳細な構造や分子量などは明らかになっていない。そこで、ゲル濾過高速液体クロマトグラフィーを用いてクチナシ青色素の分子量測定を試みた。市販のクチナシ青色素 A、B、C の 3 種を純水にて色価 0.6 に希釈し測定サンプルとした。分子量マーカーには Tyrosine(M181)、Ribonuclease A (M13700)、Ovalbmin(M44000)を用いた。カラムは PROTEIN KW-802.5 (Shodex) を用い、移動相は 0.02 M リン酸緩衝液(pH 7.4, 0.14 M NaCl 含有)を用いた。流速は 0.5 mL/min とし、280 および 600nm の波長で検出した。各試料を分析した結果、いずれのサンプルにおいてもピークが得られ、保持時間はクチナシ青 A が 18.88、B が 20.13、C が 20.67 であった。また、分子量マーカーの保持時間をもとに得た較正曲線を用いて分子量分布および各分子量を算出した。重量平均分子量はクチナシ青 A が 41,000、クチナシ青 B が 12,000、クチナシ青 C が 9,000 であった。

The gardenia blue pigment is one of the natural pigments. It is used in various processed foods as a food additive. This pigment is produced by adding β-glucosidase to a mixture of iridoid glycosides obtained from gardenia fruits and protein hydrolyzates, and expected to be a polymer composed of genipin, amino acids and peptides. But its structure and molecular weight are unknown. Therefore, we examined the molecular weight of this pigment by gel filtration high performance liquid chromatography. As a result, we got a peak in each sample. We had the retention time of gardenia blue pigment A was 18.88 minutes, B was 20.13 minutes, and C was 20.67 minutes. Besides, we calculated the calibration curve using the retention time of the molecular weight marker. We substituted the retention time we got by analysis of samples into the calibration curve to calculate the molecular weight. The weight-average molecular weight of the gardenia blue pigment A was 41088, B was 11809, and C was 8901.

gardenia blue pigment, molecular weight, gel filtration

講演番号：2E06-14
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 13:00～ ミーティングルーム E

溶液喫飲後の口腔内呈味成分経時測定法

Monitoring the temporal release of tastant in mouth from solution after drinking

○中田 勇二、辻 史忠、林 和寛（味の素（株））
○Yuji NAKADA, Fumitada TSUJI, Kazuhiro HAYASHI (AJINOMOTO.CO.,INC.)

フレーバーは、食品の嗜好性や採択・選択に大きく関与している。また、フレーバーは味と香りを同時に受容することから両者を区別することなく総合的な感覚として認識される。食品を口に含むと、香気成分は口腔内の気相に放散され、呼気とともにレトロネーザル経路で鼻腔内に到達し、その到達量は刻一刻と経時変化する。演者らは Direct-MS を用いて、摂食嚥下後、鼻腔内に到達した香気成分量を経時的に測定し、テルペン類や一部のアルデヒド類は鼻腔残存性が低い香気成分であり、一方ピラジン類やアルコール類は鼻腔残存性が高い香気成分であることを報告した。[1)]

本研究では、呈味溶液を口に含み嚥下した後の舌上における呈味成分残存量の経時測定法を検討した。NaCl 溶液及び MSG 溶液を口に含み直ちに嚥下した後、綿棒を用いて舌上の唾液を採取した。唾液中の Na イオンは ICP 発光分光分析装置、唾液中のグルタミン酸は LC-MS を用いて測定を行った。舌上呈味成分量は NaCl 水溶液、MSG 水溶液ともに、嚥下後 10～20 秒まで増加しプラトーに達し、嚥下後 30 秒間は口腔内に高水準維持されることを確認した。これまでの検討結果から、溶液嚥下後は呈味成分舌上残存量に対し香気成分鼻腔内残存量の減少率が著しいことから、高鼻腔残存香気成分の活用はフレーバーを増強させるのに有効であることが示唆された。

1） 中田勇二ほか、 日本食品科学工学会第65回大会講演集 3Aa7

Flavor is a main driver of food palatability, acceptance and choice. The overall perception of flavor is considered as an integration of simultaneous sensory perceptions including taste and aroma. Both taste and aroma change over the period food is eaten, and the temporal changes of volatile flavors have been monitored in vivo in our laboratory using Direct-MS.

The purpose of this study was to monitor the temporal release of NaCl and MSG from solution in mouth after drinking. Swabs of saliva were taken from tongue and analyzed using Inductively coupled plasma atomic emission spectrometry and Liquid chromatography mass spectrometry. The temporal analysis of the chemical stimuli provided NaCl and MSG remain in mouth longer than aroma compounds in nose. From these findings, we suggested that long lasting aroma compounds in nose are effective for flavor enhancement.

temporal release, in mouth, tastant

発表責任者：中田勇二（yuuji_nakada@ajinomoto.com）

講演番号：2E06-15
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 13:00～ ミーティングルーム E

摘果柿を利用した“高齢者用食品”－エマルジョンを用いたシトラールの劣化抑制効果－

Food for elderly people using immature persimmon "Tekka-kaki". - Deterioration depression effect of citral using the emulsion

○吉岡 佐知子[1]、大西 夏実[2]、楠戸 邦弘[1]、和田 瑞彩[1]、渡邉 義之[3]、菅野 憲一[4]、野村 正人[3]、澤邊 昭義[1,2] ([1]近畿大農、[2]近畿大院農、[3]近畿大工、[4]近畿大産理工)

○Sachiko YOSHIOKA[1], Natsumi OHNISHI[2], Kumihiro KUSUDO[1], Mizusa WADA[1], Yoshioyuki WATANABE[3], Kenichi KANNO[4], Masato NOMURA[3], Akiyoshi SAWABE[1,2] ([1]Faculty of Agriculture, Kindai University, [2]Graduate school of Agriculture, Kindai University, [3]Faculty of Engineering, Kindai University, [4]Department of Biological and Environmental Chemistry, Kindai University)

私たちは，未利用植物資源，また食品加工などで産出される「食用資源」の皮や種などの残渣を用いて，より価値が付加されたエキスや成分を見出し，健康食品や化粧品への利用を目的に研究を行っている．その一環として，本研究では，摘果柿を有効利用することを目的とし，食品添加物としての利用を試みた．飲料やエマルションを用いた高齢者用食品の風味の劣化抑制剤としての利用の観点から柑橘系香料であるシトラールの劣化抑制効果や食品添加物としての抗菌作用について検討した．

(a) 高齢者用食品の風味の劣化抑制剤としての利用の観点から柑橘系香料であるシトラールの劣化抑制効果

citral の分解は酸性条件と酸化条件の両方で発生する可能性があるため, エマルションの形態をとることで, citral の安定性が向上する可能性がある．本研究では油相に dodecane, tetradecane, octadecane の 3 種の alkane を用い，そこに citral を混合させ，水相には乳化剤の SY-glyster を用いた．ここでは，最適なアルカンの検討と，エマルションの形態での摘果柿による citral の劣化抑制効果について検討を行った．ほとんど全ての条件で control と比較して TPA，GA ともに citral 量が高くなった．GC-MS により，劣化物質として myrcenol と linalooloxide が検出されたが，その他の劣化物質は検査されなかった．

(b) 食品添加物としての抗菌作用

Staphylococcus aureus NBRC 13276，*Bacillus subtilis* NBRC3134，*Escherichia coli* NBRC3301，*Pseudomonas aeruginosa* NBRC13275 および *Klebsiella pneumoniae* NBRC 13277 を用いて，摘果柿による抗菌効果について検討中である．

本研究では，未利用資源である摘果柿が柑橘系香料であるシトラールの劣化抑制効果を示したことから，高齢者用食品などへの食品添加物としての利用が期待される．

The target of this study is effective utilization of the immature persimmon "Tekka-kaki". In this study, we examined a deterioration inhibitory effect of citrus fruit fragrance citral and obtained an interesting finding. As for compounds and extracts of "Tekka-kaki", it might be used in general as supplement or food additives to take every day.

immature persimmon "Tekka-kaki", Food for elderly people, Deterioration depepression effect

発表責任者：吉岡佐知子（yoshioka@nara.kindai.ac.jp）

講演番号：2E06-16
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 13:00～ ミーティングルーム E

国産メロン 20 品種の香気プロファイリング

Aroma profiling of 20 domestic melon cultivars

○田中 福代[1]、大寺 宇織[2]、八城 和敏[2,4]、葛谷 真輝[2]、瀬角 美穂[3]、中野 優子[3]、早川 文代[3]([1]農研機構中央農研、[2]茨城農総セ生工研、[3]農研機構食品部門、[4]茨城県筑西地域農業改良普及センター)
○Fukuyo TANAKA[1], Takaori Odera[2], Kazutoshi Yashiro[2,4], Maki Kuzuya[2], Miho Sesumi[3], Yuko Nakano[3], Fumiyo Hayakawa[3] ([1]Central Region Agricultural Research Center, NARO, [2]Plant Biotechnology Institute, IBARAKI Agricultural Center, [3]Food Research Institute, NARO, [4]IBARAKI Chikusei Agricultural Extention Center)

メロンは嗜好性の高い食品であり、その風味の特徴や嗜好性には香りの寄与が大きいと推定される。日本国内においてこれまでに多様なメロンが育種され、各地で栽培されているが、これまでに品種、栽培、産地等による香気プロファイルの比較例は少ない。そこで、代表的な品種のメロンを収集し、プロファイリングを行った結果について報告する。

【方法と結果】各種系統の国産 20 品種のメロン 59 試料について解析を行った。「イバラキング」「アンデスメロン」「プリンスメロン」をはじめとする大多数の品種は茨城県農業総合センター生物工学研究所で栽培した試料について同一条件で収穫、試料調製をした。また、「イバラキング」については栽培条件の異なる試料、「肥後グリーン」「アンデスメロン」「キンショーメロン」「夕張メロン」「クラウンメロン」などについては茨城県内で流通している市販品、または市場を通じて取り寄せた試料を用いた。果肉に塩化ナトリウムを添加して調製した汁液の揮発性成分を TD-GC-MS を用いて網羅的に分析した。分析データについて主成分分析を実施した結果、全品種の中で「夕張メロン」と「プリンスメロン」、「キンショーメロン」が際立った特徴を呈した。比較可能な試料を組み合わせ解析したところ、生産者または栽培地域、果肉色、栽培方法により特性が異なり、ネットの有無、皮色による特徴は認められず、部位による違いは品種間差より小さかった。

Aroma plays an important role in the preferential selection of melons. A lot of melon cultivars have been developed and cultivated in various regions in Japan. However, differences in aroma characteristics among cultivars, cultivation methods, and production regions have not yet been fully understood. Therefore, in this study, we performed aroma profiling of the major domestic melon cultivars.

We collected the fruits of 20 major melon cultivars, including ‘Ibaraking’, ‘Andes’, ‘Prince’, ‘Higo Green’, ‘Yubari’ and ‘Crown’ melons and performed thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry to analyze the aroma components of the juice obtained from their flesh. Principal component analysis revealed discriminating aroma component profiles for ‘Yubari’, ‘Prince’, and ‘Kinsyo’ melons. Flesh color and cultivation method contributed considerably toward the aroma components in PC2 and PC3. However, the skin reticulation pattern, peel color, and region in the fruit did not exert significant impacts on aroma components.

Melon cultivars, Aroma profiling, TD-GC-MS

発表責任者：田中福代（fukuyot@affrc.go.jp）

講演番号：2E06-17
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 13:00～ ミーティングルーム E

生産地および保存温度の違いが白カビ熟成チーズの成分プロファイルに与える影響

Effect of production area and storage temperature on the constituent profile of white mold cheeses

○佐藤 実穂、海野 良輔、鈴木 敏弘、石川 森夫（東農大院・醸造）
○Minori SATO, Ryosuke UNNO, Toshihiro SUZUKI, Morio ISHIKAWA (Dept. Ferment. Sci., Tokyo Univ. of Agric.)

【背景・目的】フードミクスは様々な食品の成分を網羅的に分析することで、簡便にその特徴や違いを評価できる有力な手法である。一方、ナチュラルチーズにおいてはスターター菌だけではなく熟成段階で自然発生的に増殖する微生物がチーズの特徴付けに関与しているが、各チーズ間における成分と微生物、成分と製法などの関連は未だに明らかとなっていない現状がある。このことから、ナチュラルチーズにフードミクスを適用することで、生産地や保存温度の違いが成分プロファイルやその経時変化に与える影響を明らかにできる可能性がある。本研究では、ナチュラルチーズの中でも微生物、成分と製法などの関連について不明な点が多い「白カビ熟成チーズ」に着目し、各種チーズの保存期間と温度における成分変化についてフードミクスを適用することで検証を行った。
【実験方法】国産およびフランス産の白カビ熟成チーズ各 3 種、計 6 種を供試試料とした。これらのチーズをそれぞれ 4℃と 15℃で保存し、かつ一週間おきに六週目までサンプリングを行った。サンプリングしたチーズを誘導体化後に GC/MS に供することで、親水性化合物の一斉分析を行った。得られたデータを用いて各種統計解析を行い、特徴的な成分の探索とチーズ間の差異について検証した。
【結果】入手直後の国産およびフランス産チーズの成分は、国産間ではほとんど差が見られなかったのに対し、フランス産間では特定のアミノ酸において顕著な差が見られた。それらの成分について主成分分析を行ったところ、それぞれ独立したクラスターを形成することがわかった。また、保存温度の観点から、国産チーズを 4℃と 15℃で保存して各種成分変化について分析した。その結果、製造時の熟成温度と同じ 15℃で保存したほうが 4℃よりもより大幅に成分が変化しており、経時的に特定のアミノ酸が特徴的な変化挙動を示すことがわかった。現在は、より成分変化が大きいと考えられるフランス産白カビ熟成チーズでも同様に成分変化について解析を行っている。

Foodomics is a powerful method to evaluate the quality and the difference of specific component in various foods analyzing the extensive food components. In this study, to evaluate the relationship between quality and component in the Japanese and French white mold cheese, hydrophilic-compounds and trace elements were comprehensively analyzed using a gas chromatography/mass spectrometer. Although the components in Japanese cheeses were not different, the amino acid and organic acid contents were significantly different in French cheeses. PCA analysis revealed that Japanese and French cheeses form the independent clusters, suggesting that amino acids and organic acids contribute to the quality and specific difference between two types chesses.

Metabolomics, Cheese, GC/MS

発表責任者：石川森夫（m1ishika@nodai.ac.jp）

講演番号：2E06-18
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 13:00～ ミーティングルーム E

コシヒカリ交雑体 91 系統の米飯物性特性の検討

Examination of the physical properties of cooked rice of 91 Koshihikari hybrids

○早川 椋太[1]、堀 清純[2]、髙野 克己[3]、辻井 良政[3] ([1]東京農大院応生、[2]農研機構、[3]東京農大応生農化)
○Ryota HAYAKAWA[1], Kiyosumi HORI[2], Katsumi TAKANO[3], Yoshimasa TSUJII[3] ([1]Grad. Sch. Appl. Biosci. Tokyo Univ. Agric., [2]NARO, [3]Fac. Appl. Biosci. Tokyo Univ. Agric.)

米飯の物性は、米に含まれるアミロースやタンパク質の含有量や性状の影響を受ける。しかし、これらがどのように影響して米飯物性を制御しているかの知見は少ない。そこで、我々は新規の米飯物性制御の要因を見出すために、コシヒカリ交雑体の炊飯米の物性や理化学的特性を調査して、それらの関連性を検討することにした。サンプルとして、茨城県つくば市の農研機構次世代作物開発研究センターの試験圃場で栽培されたコシヒカリと旭の交雑体を使用し、物性測定試験、アミロース及びタンパク質含有率測定試験を行った。玄米サンプルを搗精し、炊飯後、米飯粒の低高圧縮法（テンシプレッサー、タケトモ電機）を用いて物性測定を行った結果、交雑体において交配親品種のコシヒカリや旭に近い物性値を示す交雑体や、それらを超える値を示す交雑体が存在し、幅広い物性の違いが確認できた。それぞれの物性値の傾向から、硬さや粘りといった各物性要因により交雑体を分類できた。表面及び全体の硬さ、付着距離を変数とした階層クラスター分析により分類したところ、類似値 0.7 の時、旭側に 4、コシヒカリ側に 6 の計 10 グループに分類でき、試料厚の項目において旭を含むグループとコシヒカリを含むグループとの間で差異が確認できた。次に、FTIR を用いて予測値を算出したアミロース及びタンパク質含有率と物性測定値との相関を求めたところ、どちらも有意な相関を得ることはできなかった。そのため、今回用いたコシヒカリ交雑体では、アミロース及びタンパク質含有率以外の要因により米飯物性が制御されている可能性が考えられた。

There is little knowledge about how the physical properties of cooked rice are controlled. Therefore, to elucidate the novel factors for controlling the physical properties of cooked rice, we investigate the relationship among physicochemical properties in progenies of Koshihikari and Asahi. As a result of measuring the physical properties of cooked rice, there are progenies showing higher and lower physical properties than koshihikari and Asahi. Hierarchical cluster analysis was performed with the hardness and adhesion distance of the surface and the whole as variables. As a result, when a similar value was 0.7, it could be classified into a total of 10 groups, 4 on the Asahi side and 6 on the Koshihikari side. There was no correlation between amylose and protein content and physical property measurements. It is considered that the Koshihikari hybrid used this time may have its physical properties controlled by factors other than amylose and protein content.

cooked rice, Koshihikari hybrid, texture

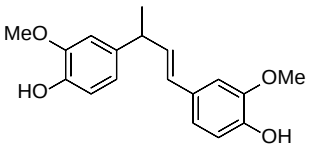
発表責任者：辻井良政（96tsujii@nodai.ac.jp）

講演番号：2E06-19
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 13:00～ ミーティングルーム E

フェルラ酸の焙煎反応物の化学構造（ポリフェノール関連物質の焙煎化学）
Chemical structures of roasting reaction products from ferulic acid (Roasting chemistry of polyphenols and related compounds)
○新道 雪乃、唐津 明日香、増田 俊哉（大阪市大院生活）
○Yukino SHINDO, Asuka KARATSU, Toshiya MASUDA (Osaka City Univ.)

【目的】人間は食材を調理・加工し食物として食べる。その過程で食材成分は変化し，中でも焙煎など高温加熱はその変化が大きい。我々はコーヒー生豆の焙煎により生成した物質が，痛風の原因となる尿酸を産生する酵素・キサンチンオキシダーゼ(XO)の働きを阻害することを見出し，その活性本体について検討してきた。しかし，非極性抽出物については成分が複雑であることから特定するのは困難であった。そこで，現在，生豆中に含まれるフェノール酸を焙煎モデルにて加熱することで，XO 阻害活性の発現とその構造の変化について解析している。以前本学会にてカフェ酸焙煎反応物について報告したが [1]，本研究ではコーヒー豆のみならず，穀物類にも存在するフェルラ酸について検討した。
【方法と結果】本研究では，焙煎モデル反応として pH 6 に相当するリン酸塩混合物 27.5 mg にフェノール酸 10 mg を加え混合，試験管に移しメタルバスで加熱することにより行った。以前報告したカフェ酸焙煎反応物では，140, 170, 200℃加熱の間で生成物質に差があったため，[2] フェルラ酸でも 140, 170, 200℃で焙煎反応したが，生成物質に大きな違いはなかった。そこで，今回は 170℃加熱物を大量に生成することにより，反応生成物の構造同定を試みた。その結果，ビニル体であるビニルグアヤコールが生成量として最も多く，そのビニルグアヤコールが分子間反応によりオリゴマー化したものや原料のフェルラ酸とカップリングしたものも特定した。なお，これらの生成物の構造的特徴は，図に示したようにビニル部で直鎖上に結合したものであった。カフェ酸焙煎反応物の主要生成物であったフェニルインダン型生成物は見られず，二種のフェノール酸間での反応性の違いが判明した。

1) 福山ら，日本農芸化学会 2018 年度大会（東京）講演要旨集 p. 1873
2) Masuda T., *et al. J. Agric. Food Chem.* 2019, 67, 8977–8989.



Roasting, one of the high-temperature treatments of food. During the roasting, various food components react and produce other compounds in the foods. In our recent investigation, the structures and activities of roasting reaction products from phenolic acids were studied. HPLC analysis of the roasting reactions at 140, 170 and 200 ℃ of ferulic acid revealed similar products regardless the reaction temperatures. These were different from the results of the reaction of caffeic acid, which was previously reported. Isolation studies of the reaction products of ferulic acid were carried out to give various oligomers that produced from vinyl guaiacol and ferulic acid by coupling at vinyl substructure. These linear coupled products were different from the reaction products from caffeic acid, which gave phenylindane oligomers.

ferulic acid, roasting reaction, xanthine oxidase inhibition

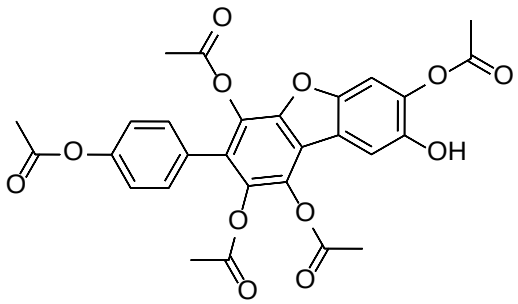
講演番号：2E06-20
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 13:00～ ミーティングルーム E

クロカワ（食用キノコ）に含まれる抗酸化活性物質に関する研究 I.活性物質の単離精製および化学構造解析

Studies on antioxidant compounds contained in mushroom *Boletopsis leucomelas* (PERS.) FAYOD (*kurokawa*) I. - Isolation and structural determination of antioxidant compounds-

○萩原 萌、及川 絢、佐藤 咲、佐藤 美穂、澤 菜月、西澤 ひなた、酒見 裕香、新藤 一敏（日女大・家政・食物）
○Moe HAGIWARA, Aya OIKAWA, Saki SATO, Miho SATO, Natsuki SAWA, Hinata NISHIZAWA, Yuka SAKEMI, Kazutoshi SHINDO (Japan Women's Univ.)

【目的】生体内で発生する活性酸素種を消去することは、生活習慣病等の疾病予防につながると考えられている。今回食用キノコのクロカワ〈*Boletopsis leucomelas* (PERS.) FAYOD〉抽出物の抗酸化試験（ラット脳脂質過酸化抑制試験）を行ったところ、強い活性があることが判明した。クロカワには, 5-lipoxygenase 阻害(抗炎症作用)や KDR kinase 阻害(抗癌作用)が報告されていたが、これら以外の生物活性の報告は見当たらないため、抗酸化物質を示す化合物の単離精製・構造解析を行った。【方法】種々のクロマトグラフィーを用いて、クロカワから抗酸化物質 1−6 を単離精製し、MS・NMR 解析によってこれらの化学構造を決定した。【結果】化合物 1−6 はいずれも *p*-terphenyl タイプの化合物であり、**1** は Bl-I,**2** は Bl-II, **4** は Bl-III, **5** は cycloleucomelon-leukopentaacetat, **6** は Bl-IV と同定され、**3** は新規な化合物であった（BI-V と命名）。**1-6** はいずれも優れた抗酸化活性（IC_{50} 0.28 ～6.3 μM）を示すことが今回初めて明らかとなった。



BI-V (**3**)

Eliminating reactive oxygen species generated in the living body is considered to lead to prevention of diseases such as lifestyle-related diseases. During the screening for antioxidant mushroom, we found *Boletopsis leucomelas* (PERS.) FAYOD (Japanese name: kurokawa)possess potent antioxidant activity against lipid peroxidation inhibitory assay. Therefore, we isolated the antioxidant compounds using chromatographic methods and determined their structures by detailed analyses of HR-MS, 1D and 2D NMR.

Compounds **1-6** were all *p*-terphenyl type compounds. **1**, **2**, **4**, **5**, and **6** were identified as Bl-I, Bl-II, Bl-III, cycloleucomelon-leukopentaacetat, and Bl-IV, respectively. Compound 3 was a new compound (we named BI-V). Compounds 1-6 showed otent antioxidant activities (IC50 0.28 to 6.3 μM). This is the first study reporting potent antioxidant activities of *p*-terphenyl type compounds

Boletopsis leucomelas (PERS.) FAYOD (*kurokawa*), *p*-terphenyl type compounds, antioxidant activity

発表責任者：新藤一敏（kshindo@fc.jwu.ac.jp）

講演番号：2E06-21
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 13:00～ ミーティングルーム E

クロカワ（食用キノコ）に含まれる抗酸化活性物質に関する研究 II. 活性物質の抗酸化活性評価及び加熱調理による変化

Studies on antioxidant compounds contained in mushroom *Boletopsis leucomelas* (PERS.) FAYOD (*kurokawa*) II. - evaluation of antioxidant activities and observation of compounds changes by cooking process-

○酒見 裕香、萩原 萌、及川 絢、佐藤 咲、佐藤 美穂、澤 菜月、西澤 ひなた、新藤 一敏（日女大・家政・食物）
○Yuka SAKEMI, Moe HAGIWARA, Aya OIKAWA, Saki SATO, Miho SATO, Natsuki SAWA, Hinata Nishizawa, Kazutoshi SHINDO (Japan Woman's Univ.)

【目的】前発表において、我々は食用キノコのクロカワ〈*Boletopsis leucomelas* (PERS.) FAYOD〉に含有される抗酸化活性物質について、それらの化学構造を明らかとした。通常我々はクロカワを調理加熱プロセスを経て摂取することから、本発表ではクロカワの様々な調理加熱による抗酸化活性物質の量的・質的な変化及び抗酸化活性の変化について検討を行った。
【方法】加熱調理としては、生のクロカワ 50 g を 2.5 mm の厚さにスライスして次の 3 つの方法を実施した。①茹で：1 L の沸騰水中で 2 分間加熱。②焼き：中火 200℃達した後、2 分間加熱。③電子レンジ：直径 15 cm の平皿に広げてラップをかけて 600W で 1 分間加熱。各加熱調理済試料は凍結乾燥し粉末化後、CH_2Cl_2→acetone で順次有機溶媒抽出して合一した。この抽出エキスについて DAD HPLC 分析を行った。また抗酸化活性試験として、抽出エキスのラット脳脂質過酸化抑制試験を実施した。
【結果及び考察】DAD HPLC 分析の結果、加熱調理物の抽出エキスでは未加熱物に含有される活性物質 **1** - **6**（前発表参照）が 1/2 から 1/3 程度に減少し、そして新しい抗酸化活性物質 **7**, **8** (BI-V), **9** (boletopsin A)が生成されることが判明した。なお **7** は新規化合物であったので BI-VI と命名した。これらの変化は **1** – **6** からのアセチル基の脱離に基づく反応であることが推定された。またラット脳脂質過酸化抑制試験の結果から、各調理加熱の抽出エキスの抗酸化活性は未加熱物のものと比較して 1/2 程度に現弱していることが判明した。

【Objective】In the previous study, we purified the antioxidant compounds in *Boletopsis leucomelas* (PERS.) FAYOD and clarified the chemical structure of them. In this study, we evaluated the quantitative and qualitative changes in the antioxidant compounds through cooking process. We also compared the antioxidant activities among cooked samples.
【Methods】Three cooked samples (①boiling, ②baking, ③microwave heating) were prepared using 50 g of mushroom. Each cooked sample was freeze-dried and powdered, and then extracted with an organic solvent (CH_2Cl_2→acetone). Each combined extract was analyzed by DAD HPLC and evaluated its antioxidant activity.
【Results &Discussion】The peak areas of **1** – **6** in the cooked extracts were decreased to 1/2 – 1/3 compared with the raw extract in the DAD HPLC analyses. We found to three new peaks (**7** (BI-VI), **8** (BI-V), **9** (boletopsin A)) in the cooked extracts (Compound **7** was a new compound). As for antioxidant activity, the activities of the cooked extracts were about half to that of the raw extract.

Boletopsis leucomelas (PERS.) FAYOD (*kurokawa*), antioxidant activity, cooking

発表責任者：新藤一敏（kshindo@fc.jwu.ac.jp）

講演番号：2F02-01
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 09:30～ ミーティングルーム F

コムラサキシメジ菌糸体培養濾液由来の植物成長調節物質の探索

Search for plant growth regulation compounds from culture broth of *Lepista sordida*

○住田 真晟[1]、呉 静[2]、崔 宰熏[1,2,3]、伊藤 彰将[3,4]、平井 浩文[1,2,3]、河岸 洋和[1,2,3] ([1]静大院・総合農、[2]静大院・グリーン研、[3]静大院・創造、[4]JSPS)
○ Masaaki SUMIDA[1], Jing WU[2], Jae-Hoon CHOI[1,2,3], Akinobu ITO[3,4], Hirofumi HIRAI[1,2,3], Hirokazu KAWAGISHI[1,2,3] ([1]Grad. Sch. of Inte. Sci. and Tech., Shizuoka Univ., [2]RIGST, Shizuoka Univ., [3]Grad. Sch. of Sci and Tech., [4]Res. Fellow Jpn. Soc. Promo. Sci.)

【目的】コムラサキシメジ（*Lepista sordida*）は、芝生がリング状に繁茂あるいは枯死した後にキノコが発生するフェアリーリングという現象を起こす菌として知られている。過去に当研究室では菌糸体培養濾液から、様々な植物体に対して成長調節活性を示す 2-azahypoxanthine（AHX）およびimidazole-4-carboxamide（ICA）を単離している。[1, 2)] 本研究ではコムラサキシメジ菌糸体培養濾液からのさらなる植物成長調節物質の単離、精製および構造決定を試みた。
【方法・結果】コムラサキシメジを２週間、YG培地によって液体培養した。得られた培養液を濾過し、菌体および培養濾液に分けた。培養濾液を*n*−ヘキサン、酢酸エチル、*n*−ブタノールで順次液−液分配、減圧濃縮後エタノールで固−液分配し、各可溶部を得た。得られた酢酸エチル可溶部をフラッシュクロマトグラフィー、HPLC等を用いて分画し、4種の化合物（**1**−**4**）の単離に成功した。これらの化合物の構造はMS、IRおよび各種NMRスペクトルデータの解析により同定し、**1**は天然から初めて単離された化合物であった。化合物**2**−**4**の植物成長調節活性を調べるためにシバ（ベントグラス）を用いて活性試験を行った。その結果、シバの根の成長に対して、**2**はコントロールと比較して強い阻害を示し、**3**, **4**は 1 µmol/paperで弱い阻害を示した。

【Purpose】Fairy rings are zones of stimulated and/or suppressed grass growth resulting from fungus-plant interaction. *Lepista sordida* is one of the fairy ring-forming fungi. In the previous studies, a plant growth promoter, 2-azahypoxanthine (AHX), and a plant growth inhibitor, imidazole-4-carboxamide (ICA), were isolated from the culture broth of the fungus.[1,2)] In this study, we tried to isolate of further plant growth regulators from the culture broth.
【Method・Results】Four compounds (**1**–**4**) were isolated from the culture broth of *L. sordida*. The structures were identified by spectroscopic data analyses and **1** was the first isolated from a natural source. The plant growth regulatory activity of **2**–**4** was investigated using bentgrass seedlings. Compound **2** showed stronger inhibition activity against the root growth than the control, ICA. Compounds **3** and **4** also showed weak inhibition activity against the root growth at 1 µmol/paper.

1) Choi. J-H, H. Kawagishi et al., *ChemBioChem* 11, 1373-1377 (2010)
2) Choi. J-H, H. Kawagishi et al., *J.Agric.Food Chem*. 58, 9956-9959 (2010)

Lepista sordida, mushroom, plant growth regulators

発表責任者：河岸洋和（kawagishi.hirokazu@shizuoka.ac.jp）

講演番号：2F02-02
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 09:30～ ミーティングルーム F

白きょう病菌（*Beauveria bassiana*）由来の生物活性物質の探索

Search for bioactive compounds from *Beauveria bassiana*

○王 俊紅[1]、日比 琢斗[1]、呉 静[2]、崔 宰熏[1,2,3]、道羅 英夫[2]、平井 浩文[1,2,3]、河岸 洋和[1,2,3]（[1]静大院・総合農、[2]静大・グリーン研、[3]静大院・創造）

○Junhong WANG[1], Takuto HIBI[1], Jing WU[2], Jae-Hoon CHOI[1,2,3], Hideo DOHRA[2], Hirofumi HIRAI[1,2,3], Hirokazu KAWAGISHI[1,2,3] ([1]Grad. Sch. of Inte. Sci and Tech., Shizuoka Univ., [2]RIGST, Shizuoka Univ., [3]Grad. Sch. of Sci. and Tech., Shizuoka Univ.)

[目的]

カイコ（*Bombyx mori*）の重要な病原菌として知られている白きょう病菌（*Beauveria bassiana*）はノムシタケ科 *Beauveria* 属の昆虫病原性真菌で、世界中の土壌で自然に生育し、主に昆虫に寄生する。アブラムシなどの害虫を防除するための生物学的殺虫剤として使用されている[1)]。またトマトやトウモロコシなどの植物体で、自然状態もしくは人工接種試験においてエンドファイトとして作用することも明らかとなっている[2)]。カイコに分生子を注入した実験では、*B. bassiana* の NBRC 103747 株は子実体を形成せず、我々が分離した SM01H 株はカイコから子実体を形成した。このことより、子実体を形成する SM01 株には子実体形成に関与する生物活性物質が存在するのではないかと考えた。また、*B. bassiana* 子実体から二次代謝物質についての研究報告はこれまでされていない。そこで本研究では、カイコを用いて栽培した *B. bassiana* SM01H 株子実体からの子実体形成に関与する物質、あるいは新規生物活性物質の探索を目的とした。

[方法・結果]

我々の研究グループでは SM01H 株を単離・同定した。SM01H 株の菌糸体を 2 週間 Potato Dextrose Agar（PDA）培地で前培養し、前培養後の PDA 培地に界面活性剤 Tween20 を加え遠心分離を行い、分生子のみを分離した。その分生子をカイコ蛹へ直接接種し、形成された子実体を凍結乾燥した。乾燥子実体をミキサーで粉砕し、*n*-ヘキサン、酢酸エチル、アセトン、エタノールおよび水で順次抽出した。各画分を減圧乾固後、各可溶部を得た。酢酸エチル可溶部をフラッシュカラムクロマトグラフィー、MPLC、HPLC を用いて分画し、新規化合物を含む数種の化合物を単離した。これらの化合物の構造は MS、IR および各種 NMR スペクトルにより決定した。さらに、各種活性試験を試みる。

[Purpose]

Beauveria bassiana is an entomopathogenic fungus of the genus *Beauveria* in the family *Clavicipitaceae*. In the experiment of injecting the conidia into the silkworm pupae, NBRC 103747 strain of the fungus did not form fruiting bodies, while SM01H strain we isolated formed fruiting bodies from the silkworm pupae. This result suggested that compound(s) produced by the SM01H strain may be involved in fruiting body formation. In addition, since fruiting body-forming strains are rare in *B. bassiana*, there is no research reported on secondary metabolites of the fruiting bodies. In this study, our purpose is to search for compounds involved in fruiting body formation or novel bioactive compounds from the SM01H strain infected to silkworm pupae.

[Method・Results]

The dried fruiting bodies were crushed with a mixer and extracted sequentially with *n*-hexane, ethyl acetate, acetone, ethanol and water. Each fraction was dried under reduced pressure. The ethyl acetate-soluble part was fractionated by flash column chromatography, MPLC, and then HPLC. As a result, several compounds including a novel compound were isolated. The structures of the compounds were determined by MS, IR and various NMR spectra. Furthermore, some bioassays will be conducted.

参考文献

1) Mascarin, G.M., Jaronski, S.T. *World J Microbiol Biotechnol* **32,** 177 (2016)

2) 小池正徳・相内大吾, 蚕糸・昆虫バイオテック 82 (3)、169－173 (2013)

bioactive compounds, *Beauveria bassiana*, structure determination

発表責任者：河岸洋和（kawagishi.hirokazu@shizuoka.ac.jp）

講演番号：2F02-03
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 09:30～ ミーティングルーム F

ニンギョウタケ(*Albatrellus confluens*)子実体由来の生物活性物質の探索

Search for bioactive compounds from *Albatrellus confluens*

○下崎 康平[1]、呉 静[2]、崔 宰熏[1,2,3]、平井 浩文[1,2,3]、河岸 洋和[1,2,3] ([1]静大農・応生科、[2]静大・グリーン研、[3]静大院・創造)

○ Kouhei SHIMOZAKI[1], Jing WU[2], Jae-Hoon CHOI[1,2,3], Hirohumi HIRAI[1,2,3], Hirokazu KAWAGISHI[1,2,3] ([1]Fac. of Agric., Shizuoka Univ., [2]RIGST, Shizuoka Univ., [3]Grad. Sch. of Sci. and Tech., Shizuoka Univ.)

【目的・背景】　ニンギョウタケ（*Albatrellus confluens*）はニンギョウタケモドキ科ニンギョウタケモドキ属の可食性のキノコである。全体の直径が 20 cm 以上、傘は肉厚で扇形やへら形、柄は傘の横や中心を外れた位置にできる形をしたキノコで、日本やヨーロッパ、北アメリカにみられる[1)]。当研究グループでは過去に、ニンギョウタケ子実体の酢酸エチル可溶部から、血漿コレステロール低下作用をもつ物質を単離した[2)]。本研究では、ニンギョウタケ子実体の *n*-ヘキサン可溶部から、新たな生物活性物質の単離、精製、構造決定を目的とした。

【方法・結果】　ニンギョウタケ子実体をエタノール、アセトンにより抽出し、両抽出物をまとめて、減圧濃縮した。その後、*n*-ヘキサン、酢酸エチルを用いて順次液-液分配、減圧乾固後エタノールを用いた固-液分配を行うことで各可溶部を得た。*n*-ヘキサン可溶部をフラッシュクロマトグラフィー、MPLC および HPLC 等を用いて分画し、化合物の単離・精製を試みた。その結果、数種化合物の単離に成功した。これらの化合物の構造は MS および各種 NMR スペクトルにより決定した。現在これらの化合物を各種活性試験に供し、生物活性について検討している。

【Purpose・Background】　*Albatrellus confluens* is an edible mushroom in the family Albatrellaceae, the genus *Albatrellus*. They are found in Japan, Europe and North America[1)]. Our group have previously isolated compounds with a lowering effect on plasma cholesterol from the ethyl acetate soluble part of the fruiting bodies of the fungus[2)]. In this study, we attempted to isolate and determine structures of the new bioactive compounds from the *n*-hexane soluble part.

【Methods・Results】　The fresh fruiting bodies were extracted with ethanol and acetone. After the solutions were combined and concentrated under reduced pressure, and then sequentially extracted with *n*-hexane, ethyl acetate, and then dried under reduced pressure. The dried materials were extracted with ethanol. The *n*-hexane soluble part was fractionated by flash chromatography, MPLC and HPLC. As a result, several compounds were successfully isolated. The structures of the compounds were determined by MS and various NMR spectra. These compounds are now being tested for their biological activity.

1）今関　六也ら、日本のきのこ、山と渓谷社、448（1999）

2）K. Sugiyama, *et al, J. Nutr. Sci. Vitaminol.,* 38, 335-342, (1992)

Albatrellus confluens, mushroom, structural determination

発表責任者：河岸洋和（kawagishi.hirokazu@shizuoka.ac.jp）

講演番号：2F02-04
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 09:30～ ミーティングルーム F

シロオニタケ子実体由来の生体機能性物質の探索

Search for biofunctional compounds from fruiting bodies of *Amanita virgineoides*

○小椋 隆平[1]、上石 優作[1]、呉 静[2]、近藤 満[2,3]、崔 宰熏[1,2,3]、平井 浩文[1,2,3]、河岸 洋和[1,2,3] ([1]静大院・総合農、[2]静大・グリーン研、[3]静大院・創造)
○Ryuhei OGURA[1], Yusaku KAMIISHI[1], Jing WU[2], Mitsuru KONDO[2,3], Jae-Hoon CHOI[1,2,3], Hirofumi HIRAI[1,2,3], Hirokazu KAWAGISHI[1,2,3] ([1]Grad. Sch. of Inte. Sci. and Tech., Shizuoka Univ., [2]RIGST, Shizuoka Univ., [3]Grad. Sch. of Sci. and Tech., Shizuoka Univ.)

【目的・背景】　テングタケ科テングタケ属に属するキノコは、現在500～600が種として認められており、毒キノコが多いことで知られている。その1種であるシロオニタケ（*Amanita virgineoides*）は、夏から秋にかけてシイ、カシ、クヌギ、コナラ林などの地上に発生し、日本，韓国，中国に分布する。このキノコから過去に単離されてきた物質には、抗菌活性を示すL-cyclopropylalanineがある[1)]。しかし、その他の活性物質の単離の報告は全く行われていなかった。本研究では、シロオニタケ子実体からの機能性物質の探索を目的とした。
【方法・結果】　シロオニタケ子実体を80%エタノール、アセトンで抽出し、両抽出物をまとめて減圧濃縮後、抽出物を*n*−ヘキサン、酢酸エチルで順次液−液分配、減圧乾固後エタノールで固−液分配し、各可溶部を得た。このうち酢酸エチル可溶部を各種クロマトグラフィーにて分画し、数種類の新規化合物の単離に成功した。単離された化合物の構造はMS、IRおよびNMRスペクトルデータの解析によって決定した。さらに，それらの化合物で各種活性試験を試みた。

【Purpose and Background】　The mushrooms belonging to the genus *Amanita* in the family Amanitaceae are currently recognized about 500 to 600 species, and many of them are known as poisonous mushrooms. One of them, *Amanita virgineoides*, grows on the ground of forest from summer to autumn, and is distributed in Japan, South Korea, and China. Previously, L-cyclopropylalanine, which showed antibacterial activity, has been isolated from the fruiting bodies of the fungus. However, there has not been any other reports of isolation of compounds from it, therefore, we attempted to isolate biofunctional compounds from the fruiting bodies.
【Methods and Results】　The fruiting bodies of *A. virgineoides* were extracted with 80% ethanol and acetone. After the solutions were combined and concentrated under reduced pressure. The extracts were fractionated into *n*-hexane soluble part, an ethyl acetate soluble part, and then dried under reduced pressure. The dried materials were extracted with ethanol. The ethyl acetate-soluble part was fractionated by repeated chromatography, and several new compounds were successfully isolated. The structures of the compounds were determined by analyses of MS, IR and NMR spectral data. In addition, among these compounds, those with high yields will be subjected to some bioactive assays.

1) Bingji, M. *et al.*, *molecules*, 2017, **22**, 2224

Amanita virgineoides, mushroom, structural determination

発表責任者：河岸洋和（kawagishi.hirokazu@shizuoka.ac.jp）

講演番号：2F02-05
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 09:30～ ミーティングルーム F

シイタケの fruiting liquid(FL)由来の機能性物質の探索

Search for functional compounds from fruiting liquid of *Lentinula edodes*

○横堀 沙英[1]、呉 静[2]、近藤 満[2,3]、深山 陽一朗[4]、崔 宰熏[1,2,3]、平井 浩文[1,2,3]、河岸 洋和[1,2,3] ([1]静大院・総合農、[2]静大・グリーン研、[3]静大院・創造、[4]株式会社シャンピニオン)
○Sae YOKOBORI[1], Jing WU[2], Mitsuru KONDO[2,3], Yoichiro FUKAYAMA[4], Jae-Hoon CHOI[1,2,3], Hirofumi HIRAI[1,2,3], Hirokazu KAWAGISHI[1,2,3] ([1]Grad. Sch. of Inte. Sci. and Tech., Shizuoka Univ., [2]RIGST, Shizuoka Univ., [3]Grad. Sch. of Sci. and Tech., Shizuoka Univ., [4]Champignon Inc.)

【背景・目的】　キノコの形態や機能は多種多様であり、古くから食用のみならず、生薬あるいは漢方薬として重宝されてきた。そのためキノコから様々な生理作用を示す化合物が数多く単離されている。キノコの子実体形成の直前に液体が分泌される。我々は，この液体は子実体形成に深く関与していると考えられ，　fruiting liquid（FL）と命名した。本研究室で以前、各種キノコの FL から様々な子実体誘導物質が単離されている。[1)] 本研究では、シイタケの菌床栽培で得られたシイタケ FL からの子実体誘導物質を含む各種生物活性物質の単離・精製および構造決定を目的とした。
【方法・結果】　シイタケ FL を減圧濃縮し、その後、*n*-ヘキサンおよび酢酸エチルで順次液-液分配、エタノールで固-液分配し、減圧乾固後、各可溶部を得た。得られた酢酸エチル可溶部を、HPLC を用いて分画し、化合物の単離および精製を試みた。その結果、酢酸エチル可溶部から数種の新規化合物の単離に成功した。単離された化合物の構造は MS、IR および各種 NMR スペクトルデータの解析によって決定した。現在、これらの化合物を各種活性試験に供している一方で、更なる化合物の単離を試みている。
【Purpose】　Mushrooms have a wide variety of forms and functions and have long been valued not only for food, but also as herbal remedy or Chinese medicine. In general, liquid is secreted on the mycelia's surface just before formation of fruiting bodies. However, researchers involved in mushroom science have never paid attention to the liquid up until the present. We hypothesized that the liquid played an important role in fruiting-body formation, and named it “fruiting liquid (FL)”. Fruiting body-inducers have been previously isolated from FL of a few kinds of mushrooms.[1)] In this study, we attempted to isolate functional compounds from the FL of *Lentinula edodes*.
【Methods and Results】　The fruiting liquid of *L. edodes* was concentrated under reduced pressure, and the extract was fractionated into a *n*-hexane part, an ethyl acetate part, an ethanol part and an aqueous part. Then, the ethyl acetate-soluble part was fractionated by repeated chromatography, and a few new compounds were successfully isolated. The structures of the compounds were identified by analyses of MS, IR and NMR spectral data. In addition, these compounds were subjected to some bioactive assays.

1) 呉静ら、天然有機化合物討論会　講演要旨集　p37

Lentinula edodes, mushroom, structural determination

発表責任者：河岸洋和（kawagishi.hirokazu@shizuoka.ac.jp）

講演番号：2F02-06
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 09:30～ ミーティングルーム F

キナメツムタケ子実体由来の生体機能性物質の探索

Search for biofunctional compounds from *Pholiota spumosa*

○池尾 太良[1]、高橋 真奈美[2]、呉 静[3]、崔 宰熏[1,2,3,4]、平井 浩文[1,2,3,4]、河岸 洋和[1,2,3,4] ([1]静大・農、[2]静大院・総合農、[3]静大・グリーン研、[4]静大院・創造)
○TAIRA IKEO[1], MANAMI TAKAHASHI[2], Jing Wu[3], Jae-Hoon Choi[1,2,3,4], Hirai Hirofumi[1,2,3,4], Hirokazu Kawagishi[1,2,3,4] ([1]Fac. of Agric., Shizuoka Univ., [2]Grad.Sch. of Inte. Sci. and Tech., Shizuoka Univ., [3]RIGST, Shizuoka Univ., [4]Grad. Sch. of Sci. and Tech., Shizuoka Univ.)

【目的】キノコの形態や機能は多種多様であり、古くから食用のみならず、製薬あるいは漢方薬として用いられてきた。そのため、これまでにもキノコから様々な生物作用を示す化合物の単離が数多く報告されている。キナメツムタケ（*Pholiota spumosa*）はモエギダケ科スギタケ属のキノコで、秋から晩秋にかけて倒木上やその周辺に発生する食用キノコである。この子実体から単離された maytenine、pholiotic acid、putrescine-1,4-dicinnamide は、前立腺がん細胞の細胞増殖を阻害するという報告が以前にされているが、研究例は多くは無い[1,2]。本研究では、キナメツムタケの子実体から新規化合物の単離・精製を試みた。
【方法・結果】キナメツムタケ子実体粗抽出液をエタノールとアセトンで抽出し、*n*-ヘキサン-水、酢酸エチル-水で液-液分配を行い、*n*-ヘキサン可溶部および酢酸エチル可溶部を得た。酢酸エチル可溶部をフラッシュカラムクロマトグラフィー、MPLC、HPLC を用いて分画し、新規化合物を含む数種の化合物の単離に成功した。その後、新規化合物の絶対配置の決定および単離した化合物の各種活性試験を行った。

【Objective】The forms and functions of mushrooms are diverse. Mushrooms have been used not only for food but also for pharmaceutical and herbal purposes since ancient times. Therefore, many compounds with various biological effects have been isolated from mushrooms. *Pholiota spumosa* is an edible mushroom in the family Moedaceae, the genus of Pholiota that occurs on and around fallen trees from fall to late fall. Maytenine, pholiotic acid, and putrescine-1,4-dicinnamide isolated from the fruiting bodies of *P. spumosa* have been previously reported to inhibit cell proliferation of prostate cancer cells. In this study, we attempted to isolate new compound(s) from the fruiting bodies of the fungus.
【Method and Results】A liquid-liquid partitioning procedure of the crude extracts of the fruiting bodies was carried out between *n*-hexane-water and ethyl acetate-water to obtain the *n*-hexane-soluble and ethyl acetate-soluble parts. The ethyl acetate soluble part was fractionated by flash column chromatography, MPLC, and HPLC.As a result, the compounds containing the new ones were successfully isolated. Subsequently, the absolute configuration of the isolated new compounds was determined and their activity was tested.

参考文献

1）Marco C, *et al*., *Eur. J. Org. Chem.*, **33**, 5551-5559 (2007)
2）Russo A, *et al*., *Phytomedicine*, **14**, 185-191 (2007)

Pholiota spumosa, mushroom, structural determination

発表責任者：河岸　洋和（kawagishi.hirokazu@shizuoka.ac.jp）

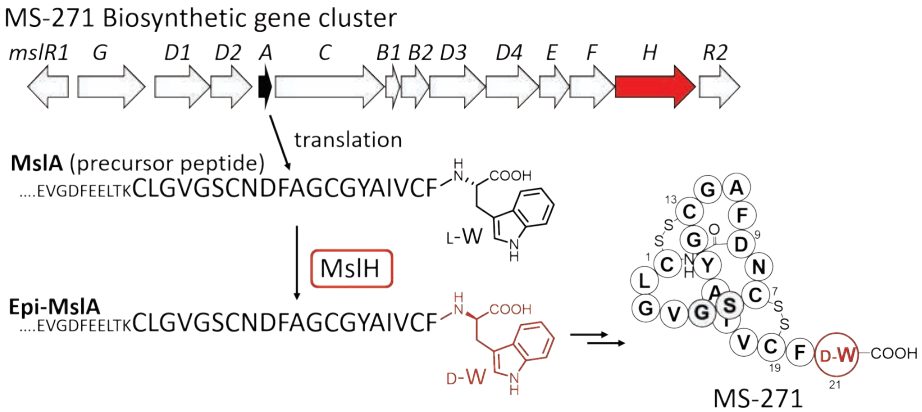
講演番号：2F02-07
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 09:30～ ミーティングルーム F

Identification and Characterization of a Novel Peptide Epimerase Responsible for the C-terminal D-Tryptophan Introduction in the Biosynthesis of Lasso Peptide, MS-271

○Zhi FENG[1], Yasushi OGASAWARA[2], Tohru DAIRI[2] ([1]Grad. Sch. Chem. Sci. Eng., Hokkaido Univ., [2]Grad. Sch. Eng., Hokkaido Univ.)

[Introduction] Lasso peptides are ribosomally synthesized and post-translationally modified peptides (RiPPs) with a characteristic isopeptide-bonded slipknot structure. MS-271, isolated from *Streptomyces* sp. M-271, is a lasso peptide comprising 21 residues with a D-tryptophan (Trp) residue at its C-terminus.[1] Recently, we identified the biosynthetic gene cluster of MS-271 (*msl*) and showed that the D-Trp in MS271 was introduced via epimerization of the precursor peptide MslA.[2] Furthermore, heterologous expression experiments of the *msl* cluster revealed that it contained all necessary genes for MS-271 biosynthesis. However, the cluster lacked obvious candidate genes for the epimerization. Because MslH was the only protein of unknown function in the cluster, we hypothesized that MslH is responsible for the epimerization of the C-terminal Trp.

[Results and Discussion] To investigate the function of MslH, *mslA* was expressed in *E. coli* in the presence or absence of *mslH*. After the purification and acid hydrolysis of MslA, the chirality of the C-terminal Trp was analyzed by a modified Marfey's method. As the results, D-Trp was observed only in the presence of *mslH*, indicating that MslH catalyzed the epimerization of the nascent precursor peptide to generate its epimer. We also demonstrated that MslH catalyzing epimerization does not require any cofactor by *in vitro* experiments. MslH is the first cofactor-independent epimerase identified in RiPPs biosynthesis.



References

[1] Yano, K. *et al. Bioorg. Med. Chem.* **1996**, *4*, 115.
[2] Feng, Z. *et al. ChemBioChem* **2018**, *19*, 2045.

D-amino acid, epimerase, lasso peptide

発表責任者：大利徹（dairi@eng.hokudai.ac.jp）

講演番号：2F02-08
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 09:30～ ミーティングルーム F

ポリグルタミン酸生合成におけるエピメリ化酵素の同定

Epimerase involved in polyglutamic acid biosynthesis

○加藤 陽菜多[1]、小笠原 泰志[2]、大利 徹[2] ([1] 北大院総化、[2] 北大院工)
○Hinata KATO[1], Yasushi OGASAWARA[2], Tohru DAIRI[2] ([1]Grad. Sch. Chem. Sci. Eng., Hokkaido Univ., [2]Grad. Sch. Eng., Hokkaido Univ.)

研究背景）ポリ-γ-グルタミン酸　(PGA)　は、*Bacillus* 属細菌により生産される D,L-グルタミン酸 (Glu) の混合ポリマーである。PGA の生合成には 4 つの酵素 PgsB、PgsC、PgsA、PgsE の関与が示されているが、いずれも膜酵素であり *in vitro* での機能解析は殆ど行われていない。最近当研究室でペプチド系天然物 MS-271 の生合成に関わる新規ペプチドエピメラーゼ MslH を見出しており、これが PgsA と高い相同性を有することから、PGA の生合成においても PgsA によるポリ-L-Glu のエピメリ化反応で混合ポリマーを生合成する可能性が考えられた。これまで、標識 Glu の投与実験により、PGA の生合成にエピメリ化反応が関与することを実証したが[1]、PgsA がエピメリ化酵素である証拠はない。本研究では、PGA 生産菌により PGA 中の D-Glu 含有率が異なることを利用し、PgsA を入れ替えることにより、D-Glu 含有率が変化するか検討した。

方法・結果および考察）PGA の D-Glu 含有率は、*Bacillus megaterium* では 60%、*Bacillus anthracis* では 100%である。そこで、*pgsB*、*pgsC*、*pgsA*、*pgsE* について、それぞれ *B. megaterum* と *B. anthracis* 由来の遺伝子を組み合わせたプラスミドを構築し、大腸菌で PGA を異種生産した。生産された PGA 中の D-Glu の比率を分析した結果、*pgsA* の由来によって D-Glu 含有率が変化したことから、予想通り PgsA がエピメリ化反応を触媒することが示唆された。

Poly-γ-glutamic acid (PGA) is a natural polymer of D- and L-glutamic acid (Glu) linked by isopeptide bonds. PGA is biosynthesized by a transmembrane enzyme complex composed of PgsB, PgsC, PgsA and PgsE. However, *in vitro* functional characterization of each enzyme has never successful. Recently, we demonstrated that MslH, a homolog of PgsA, was a novel cofactor-independent peptide epimerase responsible for the biosynthesis of a D-tryptophan-containing lasso peptide natural product, MS-271. In addition, our isotope tracer experiments revealed the involvement of peptide epimerization in PGA biosynthesis as L-Glu was the sole substrate for the biosynthesis of DL-PGA.[1] However, whether PgsA catalyzes the epimerization has not been established. In the present study, we demonstrated that PgsA played an important role in controlling the D/L-ratio in PGA product.

[1] Y. Ogasawara et al. *Org. Lett.* **2019**, *21*, 3972.

polyglutamic acid, enzyme, epimerase

発表責任者：大利徹（dairi@eng.hokudai.ac.jp）

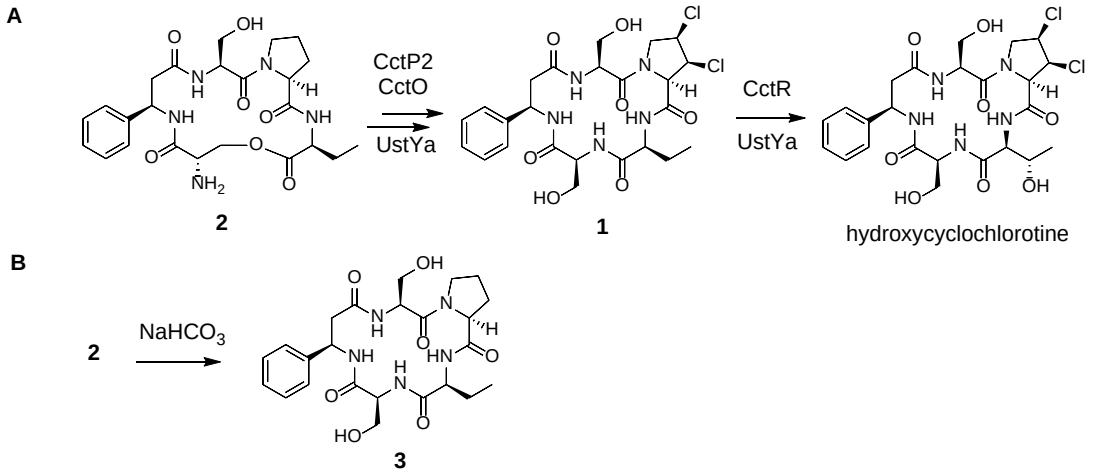
講演番号：2F02-09
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 09:30～ ミーティングルーム F

Identification of tailoring enzymes in the biosynthesis of cyclochlorotine

○Yulu JIANG[1], Taro Ozaki[1], Chengwei Liu[1], Yuya Igarashi[1], Ying Ye[1], Jun-ichi Maruyama[2], Atsushi Minami[1], Hideaki Oikawa[1] ([1]Fac. Sci., Hokkaido Univ., [2]Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo)

(Introduction) Cyclochlorotine (**1**) is a hepatotoxic and carcinogenic mycotoxin produced by *Talaromyces islandicus* (*Penicillium islandicum*), a fungal pathogen known to cause "islandia yellow rice".[1] Cyclic pentapeptide **1** consists of two serines (Ser) and nonproteinogenic amino acids, 2-aminobutyric acid (Abu), β-phenylalanine (βPhe) and 3,4-dichloroproline. It has been reported that **1** was biosynthesized by the nonribosomal peptide synthetase (NRPS) CctN.[2] However, the key halogenase related in the chlorination at unactivated carbons of proline (Pro) has not been identified yet. Here we report the identification and functional analysis of tailoring enzymes that involved in biosynthesis of **1** and its derivatives.

(Results) By analyzing the metabolites of producing strain, we identified **2**, which contains an ester linkage between Abu3 and Ser4. Under weak alkaline condition, lactone **2** readily underwent intramolecular *O*,*N*-transacylation to cyclotine (**3**), suggesting that **2** is a biosynthetic precursor of **1** and **3**. Based on the gene-knockout experiments and heterologous expression in *Aspergillus oryzae*, we revealed that three UstYa family proteins involved in chlorination of Pro, *O*,*N*-transacylation, and hydroxylation of Abu, respectively. The detailed biosynthetic pathway leading to **1** and hydroxycyclochlorotine will be discussed in the presentation.



References: (1) Yoshioka, H. *et al.*, *Chem. Lett.* **1973**, 2, 1319–1322; (2) Schafhauser, T. *et al.*, *Environ. Microbiol.*, **2016**, 18, 3728–3741.

Natural product, Biosynthesis, Peptide

発表責任者：及川 英秋（hoik@sci.hokudai.ac.jp）

講演番号：2F02-10
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 09:30～ ミーティングルーム F

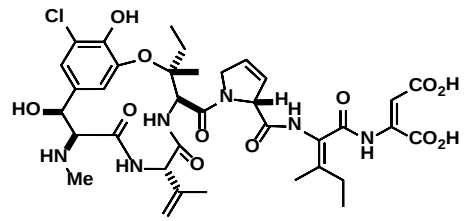
糸状菌由来リボソームペプチド phomopsin A の翻訳後修飾反応の解析

Analysis of the post-translational modification reaction of the fungal ribosomal peptide, phomopsin A

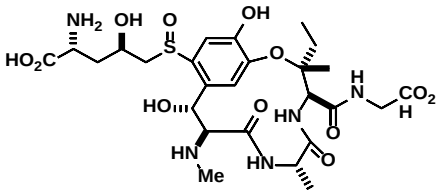
○曽ケ端 花帆、五十嵐 祐也、尾﨑 太郎、劉 成偉、南 篤志、及川 英秋（北大院理）
○Kaho SOGAHATA, Yuya IGARASHI, Taro OZAKI, Chengwei LIU, Atsushi MINAMI, Hideaki OIKAWA (Fac. Sci., Hokkaido Univ.)

Phomopsin A (**1**) は、糸状菌*Phomopsis leptostromiformis*が生産するマイコトキシンである。2016年に化合物**1**の生合成遺伝子クラスターが報告され[1]、ustiloxin B (**2**)と同様にリボソーム由来の前駆体タンパク質から合成されることが明らかになった。しかし、その生合成経路の全容はこれまで明らかにされていなかった。本研究では**1**の生合成における修飾反応の解明を目的として実験を行った。化合物**2**の生合成研究より[2]、メチル化や脱水素化等の修飾反応はマクロ環化の後に起きると推測した。我々は**1**の生産菌を用いて各生合成遺伝子のノックアウト株の作製を試みた。初めにメチル基転移酵素遺伝子と報告された*phomM*のノックアウト株を作製し代謝産物を解析したところ、**1**のdesmethyl体が蓄積した。現在、チロシンのハロゲン化や4箇所の脱水素反応を触媒する酵素についても同様の手法で解析を進めており、その詳細を報告する。

Phomopsin A (**1**) is a mycotoxin produced by *Phomopsis leptostromiformis*, which infects lupin seed and causes severe liver damage against livestock. In 2016, the biosynthetic gene cluster for **1** was reported and identified to be a ribosomally synthesized and post-translationally modified peptide (RiPP).[1] However, the biosynthetic pathway remains largely unknown. In this study, we conducted the gene knockout experiments to elucidate the biosynthetic pathway. We initially constructed the knockout mutant of *phomM* gene, which encodes *N*-methyltransferase. As a result, the obtained mutant accumulated the desmethylated derivative of **1**. To identify the genes involved in chlorination of tyrosine and dehydrogenation of amino acid residues, the knockout experiments of other biosynthetic genes are in progress. Based on the metabolites accumulated in each mutant, the biosynthetic pathway for **1** will be discussed.



phomopsin A (**1**)



ustiloxin B (**2**)

1. Ding, W. *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2016**, *113*, 3521–3526.
2. Ye, Y. *et al. Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 8072–8075.

Peptide, Enzyme, Biosynthesis

発表責任者：及川英秋（hoik@sci.hokudai.ac.jp）

講演番号：2F02-11
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 09:30～ ミーティングルーム F

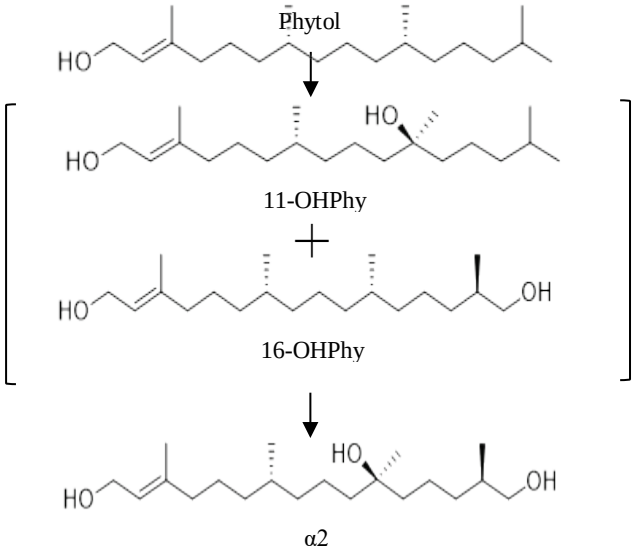
疫病菌交配ホルモンα2 の生合成中間体の同定

Identification of biosynthesis intermediates for the *Phytophthora* mating hormone α2

○今津 佑介[1]、有吉 俊[1]、大栗 隆二[2]、勝田 亮[3]、矢島 新[2]、小鹿 一[1]([1]名大農、[2]東農大院・生命、[3]東農大・生命)
○Yusuke IMAZU[1], Suguru ARIYOSHI[1], Ryuji OGURI[2], Ryo KATSUTA[3], Arata YAJIMA[2], Makoto OJIKA[1]
([1]Nagoya Univ., [2]Graduate School of Tokyo University of Agriculture, [3]Tokyo University of Agriculture)

【背景・目的】

疫病菌（*Phytophthora* 属植物病原糸状菌）は、有性生殖の際に 2 種類の交配ホルモン α1, α2 を利用する。このうち α2 は phytol から酸化酵素等により生合成されるが、その過程で中間体（11-OHPhy, 16-OHPhy）を経由すると推定されている。これを証明するため推定中間体の α2 への変換及び培養液中で存在を検証した。



【方法・結果】

P. nicotianae を、合成中間体（11-OHPhy, 16-OHPhy）を添加した水中で振盪培養した。培養物を MeCN で抽出し LC/MS に供したところ α2 の生成が検出されたことから、これらが α2 生合成の前駆体であると結論した。次に *P. nicotianae* の 3 つの株を 0.1% V8 培地で振盪培養後、上清と菌体をそれぞれ EtOAc と MeCN で抽出し、LC/MS に供した。その結果 2 つの株で中間体の存在が確認できたことから、phytol 水酸化酵素（CYP など）が α2 生合成に関与することが強く示唆された。

The plant pathogen *Phytophthora* utilize two mating hormones (α1, α2) during sexual reproduction. α2 are biosynthesized from phytol by oxidation enzymes, possibly via 11-OHPhy and 16-OHPhy as intermediates. In this study, we aimed to confirm that 11-OHPhy and 16-OHPhy are the intermediates of α2 biosynthesis.

P. nicotianae was cultured in water supplemented with each intermediates. The culture was extracted with MeCN and subjected to LC/MS, demonstrating the production of α2 from both intermediates. *P. nicotianae* (three strains) were next cultured in 0.1% V8 medium. The supernatant and the mycelia were separately extracted with EtOAc and MeCN, respectively. We confirmed the presence of the intermediates in the culture supernatant or mycelia of 2 strains by LC/MS. The results strongly suggest that phytol oxidation enzymes (e.g, CYP) are involved in the biosynthesis of α2.

Phytophthora, mating hormone, sexual reproduction

講演番号：2F02-12
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 09:30～ ミーティングルーム F

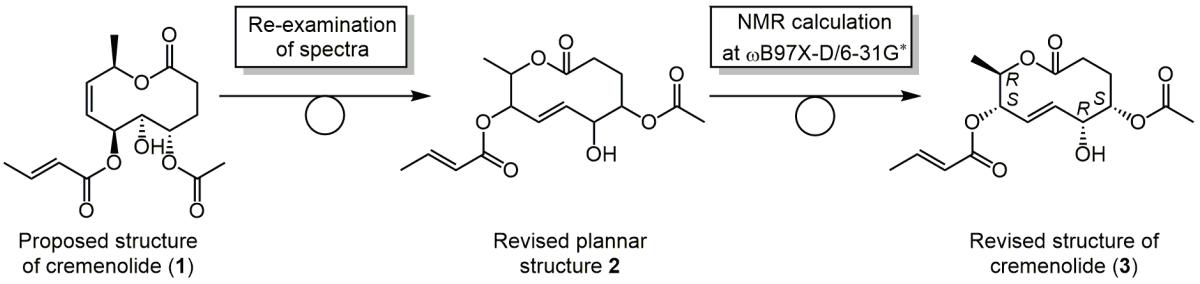
計算化学支援による cremenolide の構造改訂

Computer-aided structure revision of cremenolide.

○勝田 亮、矢島 新、石神 健、額田 恭郎（東農大・生命）
○Ryo KATSUTA, Arata YAJIMA, KEN ISHIGAMI, Tomoo NUKADA (Tokyo Univ. of Agric.)

世界人口が 80 億人に迫ろうとしている今日、食糧の増産は喫緊の課題である。農業生産に直結する植物の生長の制御およびそのメカニズムの解明は依然重要である。Cremenolide は *Trichoderma cremeum* 由来の十員環ラクトン化合物であり、トマト苗に対する根伸長促進活性、および灰色かび病菌など数種の植物病原微生物に対する生長阻害活性の双方を示す。我々は植物成長の制御にかかわる低分子化合物についての有機化学的研究の一環として、cremenolide の有用性に着目し化学的研究を開始した。

本化合物の構造は LC-MS/MS, UV および NMR スペクトルにより下図 **1** の通り提唱されたが、我々が一次元および二次元 NMR スペクトルを精査したところ構造 **1** を支持しない点が散見され、cremenolide の平面構造は正しくは **2** であると考えるに至った。一方で ^{1}H の結合定数等、立体化学の決定に必要な情報は報告されていなかったことから、想定される全ジアステレオマーの NMR 計算により立体化学の決定を行った。^{13}C 化学シフトについて、天然物と ωB97X-D/6-31G*レベルにおける密度汎関数法による計算結果を比較したところ(4*S*,5*R*,8*S*,9*R*)-体 **3** の結果が最もよく一致をしたことから、天然物の構造を改訂するに至った。本結果の合成による検証については、別途報告する。



The structure of a root growth promoting, and antibiotic decanolide, cremenolide was revised from an originally proposed structure **1** to structure **3** by a combination of re-examination of reported NMR spectra and a computer-aided method. The planner structure was determined by NMR reassignment while the relative configuration was determined by a comparison of natural and calculated ^{13}C chemical shifts based on DFT at ωB97X-D/6-31G* level of theory. This finding was further confirmed unambiguously by the synthesis of **3** and to be reported separately.

lactone, structure revision, theoretical calculation

発表責任者：勝田　亮（r3katsut@nodai.ac.jp）

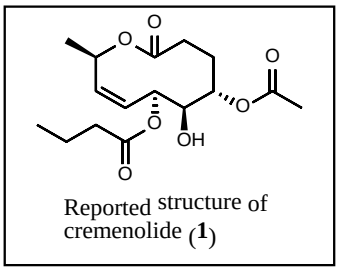
講演番号：2F02-13
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 09:30～ ミーティングルーム F

Cremenolide の合成と構造改訂

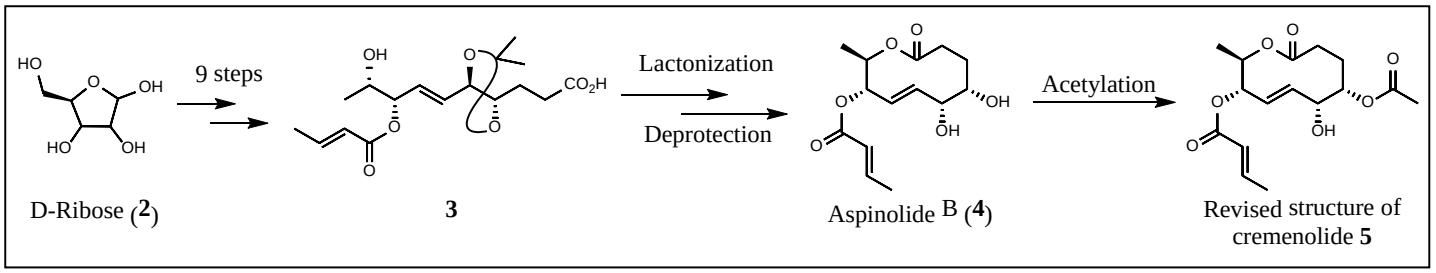
Synthesis and structural revision of cremenolide

○武田 圭太[1]、勝田 亮[2]、矢島 新[2]、石神 健[2]、額田 恭郎[2]、桑原 重文[1]([1]東北大院農、[2]東農大院農)
○ Keita TAKEDA[1], RYO KATSUTA[2], Arata YAJIMA[2], Ken ISHIGAMI[2], Tomoo NUKADA[2], Shigefumi KUWAHARA[1] ([1]Tohoku Univ., [2]Tokyo University of Agriculture)

【目的】Cremenolide は *Trichoderma cremeum* から単離された新規十員環ラクトンであり、植物病害菌に対する増殖阻害活性およびトマト苗に対する生長促進活性を示すことから、農薬としての利用が期待されている化合物である [1)]。その構造として 1D, 2D NMR スペクトルの解析により、環内に (*Z*)-二重結合を含む構造 **1** が提唱された。しかしながら、筆者らがスペクトルを独自に精査した結果、構造 **1** を支持しない箇所を見出し、NMR 計算の結果と合わせて cremenolide の真の構造は aspinolide 類縁体である構造 **5** と推定するに至った。この仮説を立証すべく、化合物 **5** の合成研究を行った。



【方法・結果】D-Ribose (**2**)を 9 工程で環化前駆体 **3** へと誘導し、光延反応によるラクトン化、続くアセトニド基の除去により aspinolide B (**4**)を合成した。これに対し、アセチル化を行うことにより化合物 **5** を単一の位置異性体として得た。合成品の ^{1}H, ^{13}C NMR は天然物と良い一致を示したことから cremenolide の真の構造は **5** であると改訂するに至った。



【Introduction】Cremenolide, a new 10-membered lactone, was isolated from *Trichoderma cremeum* and revealed its biological activity with inhibiting growth of several plant pathogens and promoting growth of tomato seedling.[1)] Reported structure of cremenolide was determined by 1D and 2D NMR spectra. However, we found that the spectra indicated aspinolide analogue **5** rather than reported structure **1**.

Therefore, we carried out our synthetic study of compound **5** to determine correct structure of cremenolide unambiguously.

【Result and Discussion】Cyclization precursor **3** was synthesized from D-ribose (**2**). Lactonization under the Mitsunobu condition and deprotection afforded aspinolide B (**4**). An acetylation of aspinolide B (**4**) gave our proposed structure of cremenolide **5** as a single isomer. It's ^{1}H and ^{13}C NMR spectra were in good agreement with those of the natural product, therefore we were succeeded in the reversion of the structure of cremenolide.

1) Francesco Vinale *et. al*., *Natural Product Research*, **2016**, *30*, 2575–2581.

Aspinolide B, Cremenolide, total synthesis

発表責任者：武田圭太（takeda.keita.r4@dc.tohoku.ac.jp）

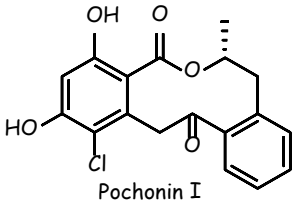
講演番号：2F02-14
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 09:30～ ミーティングルーム F

Pochonin I の合成研究

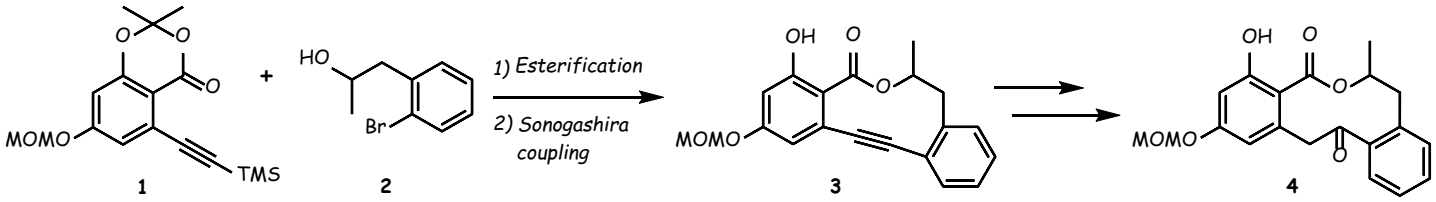
Synthetic study of pochonin I

○鈴木 悠生、勝田 亮、額田 恭郎、矢島 新、石神 健（東農大・生命）
○Hisao Suzuki, Ryo Katsuta, Tomoo Nukada, Arata Yjima, Ken Isigami (Tokyo Univ. of Agric.)

Pochonin I は子嚢菌の一種である *Pochonia chlamydosporia* より単離されたレゾルシン酸ラクトン類(RALs)であり、WNT-5A の誘導阻害活性を示すことから毛髪成長物質として期待されている。多様な生物活性を示す RALs の中でも当化合物は右部に 1,2-二置換ベンゼンという稀有な構造を有しているため、合成標的として非常に興味深い。以上のことから演者らは WNT-5A に対する誘導阻害活性の再評価及び構造活性相関の解明に繋げるべく合成経路の開発を計画した。



以下に合成の概略を示す。2,4,6-トリヒドロキシ安息香酸から誘導したアルキン **1** 及び既知のアルコール **2** を縮合した後、分子内薗頭カップリングを行うことにより pochonin I の全炭素を備えた 10 員環ラクトン **3** を効率的に合成することに成功した。今後、アルキンの水和によるカルボニル基への変換及びレゾルシノール部分への塩素の導入を経て pochonin I の合成を完了する予定である。



Pochonin I is a resorcylic acid lactone (RAL) isolated from *Pochonia chlamydosporia*. It is expected to be a hair growth substance due to its WNT-5A-inducing inhibitory activity. Among the RALs, this compound has a unique structure of 1,2-disubstituted benzene in the right part, which makes it an attractive synthetic target. Therefore, we started its synthesis.

Initially, an alkyne **1** was prepared from 2,4,6-trihydroxybenzoic acid. The base mediated condensation of **1** with known alcohol **2** was followed by an intramolecular Sonogashira coupling to produce a ten-membered lactone **3**, which contains all requisite carbons for pochonin I. As a result, we were succeeded in the efficient synthesis of the key intermediate of the synthesis pochonin I. A conversion of alkyne moiety of **3** into ketone and a chlorination is now in progress.

Total synthesis, resorcylic acid lactone, WNT-5A

発表責任者：勝田　亮（r3katsut@nodai.ac.jp）

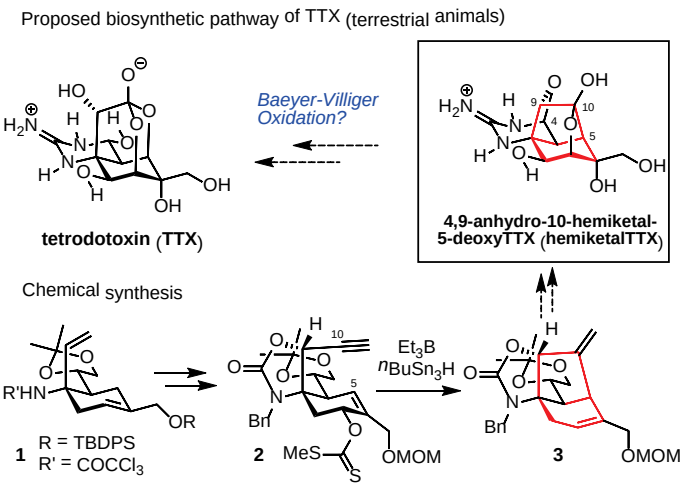
講演番号：2F02-15
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 09:30～ ミーティングルーム F

4,9-アンヒドロ-10-ヘミケタール-5-デオキシテトロドトキシンの合成研究

Synthetic studies on 4,9-anhydro-10-hemiketal-5-deoxytetrodotoxin

○宮坂 忠親[1]、安立 昌篤[2]、西川 俊夫[1]([1]名大院生命農、[2]東北大院薬)
○Tadachika MIYASAKA[1], Masaatsu ADACHI[2], Toshio NISHIKAWA[1] ([1]Nagoya Univ., [2]Tohoku Univ.)

テトロドトキシン(TTX)は、ふぐ毒の原因物質として知られているが、一部のイモリやカエル、タコなど様々な生物が保有している。その生合成については現在も未解明である。2014 年、東北大の山下・工藤らは、オキナワシリケンイモリから 4,9-アンヒドロ-10-ヘミケタール-5-デオキシテトロドトキシン(ヘミケタール TTX)を単離・構造決定した[1)]。ヘミケタール TTX は、TTX の生合成前駆体であると推定され、Baeyer-Villiger 反応によって TTX に変換されていると提唱された。我々はこの推定生合成経路に興味を持ち、化学的に Baeyr-Villiger 反応が進行し TTX へ変換されるかを検証するために、ヘミケタール TTX の合成研究に着手した。



当研究室で開発された TTX の合成中間体 **1** を出発原料とし、数段階の反応を経て化合物 **2** を合成した。次に、トリエチルボランとトリブチルスズを用いたラジカル環化反応によりヘミケタール TTX の炭素骨格を構築することができた。この合成法の詳細について報告する。

Tetrdotoxin (TTX), a toxic principle of puffer fish intoxication, is found from various marine and terrestrial animals. On the other hand, biosynthesis of TTX remains to be elucidated. However, 4,9-anhydro-10-hemiketal-5-deoxyTTX (hemiketalTTX) was isolated from a Japanese toxic newt and, proposed as a direct biosynthetic precursor of TTX by Baeyer-Villiger like oxidation.[1)] To validate the transformation of hemiketalTTX into TTX by chemical reaction, we started synthesis of hemiketalTTX.

First, compound **2** was prepared from compound **1**, a synthetic intermediate of TTX in our laboratory, in several steps. Radical cyclization reaction of **2** with Et_3B and *n*-Bu_3SnH provided compound **3**, which have a carbon skeleton of hemiketal TTX. Details of the transformation will be disclosed in the meeting.

(1) Kudo, Y. and Yotsu-Yamashita, M. *et al. Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 14546.

tetrodotoxin, biosynthesis, chemical synthesis

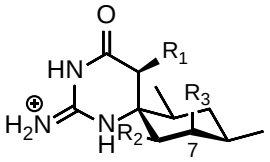
発表責任者：宮坂忠親（miyasaka.tadachika@c.mbox.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：2F02-16
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 09:30～ ミーティングルーム F

テトロドトキシンの推定生合成中間体 Tb-242C の合成研究

Synthetic study on Tb-242C, a proposed biosynthetic intermediate of TTX

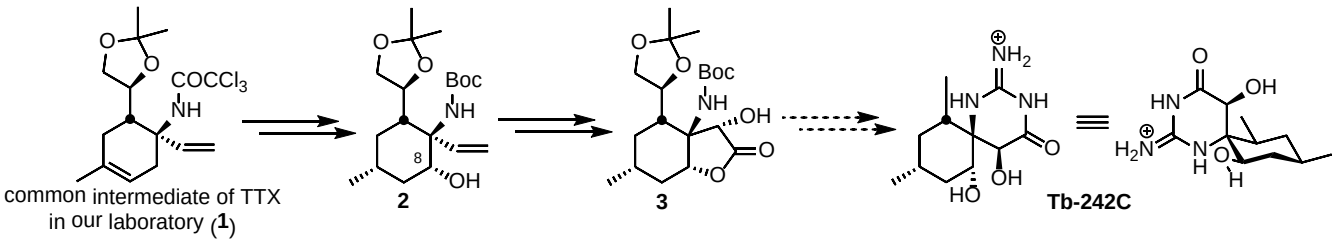
○西海 眞史[1]、西川 俊夫[1]、安立 昌篤[2] ([1]名大院生命農、[2]東北大院薬)
○Masafumi NISHIUMI[1], Toshio NISHIKAWA[1], Masaatsu ADACHI[2] ([1]Nagoya Univ., [2]Tohoku Univ.)



	R_1	R_2	R_3
Tb-210B	H	H	H
Tb-226	OH	H	H
Tb-242C	OH	OH	H
Tb-258	OH	OH	OH

フグ毒として有名なテトロドトキシン(TTX)は、海洋細菌が生産し食物連鎖によってフグに生物濃縮されていると考えられている。多数の TTX 生産菌が報告されているにも関わらず、その生合成経路や生合成遺伝子は未解明である。東北大の山下らは、フグから Tb-210B, Tb-226, Tb-242C, Tb-258 などを単離し、その構造的特徴から、これらを TTX の生合成中間体と推定した[1]。本研究は、これら推定生合成中間体の合成と構造確認、また、その安定同位体標識化体を合成し、生物への取り込み実験を通して、TTX の生合成システムを解明することを目的とした。今回我々は、当研究室で用いられてきた TTX 類の共通中間体 **1**[2] を出発原料として、Tb-242C の合成を目指し、シクロヘキサン環に必要な全ての官能基を導入した **3** の合成に成功した。

Tetrodotoxin (TTX) is well-known as a pufferfish poison. Although many TTX-producing bacteria have been identified, the biosynthetic pathway and genes have not yet been elucidated. Recentry, Yotsu-Yamashita and co-workers isolated Tb-compounds from a pufferfish and speculated that they are biosynthetic intermediates of TTX. This study aims to synthesize these compounds such as Tb-242C to confirm their structures and to synthesize stable isotope-labeled forms for feeding experiments. Currently, we succeeded in stereocontrolled synthesis of α-hydroxylactone **3** with a fully functionalized cyclohexane ring of Tb-242C from **1**, a common intermediate for TTX synthesis in our laboratory.



References

1) Yotsu-Yamashita, M. *et al. Chem. Eur. J.* ***2018***, *24*, 7250.
2) Nishikawa, T. *et al*. *Angew. Chem. Int. Ed*. **1999**, *38*, 3081.

Tetrodotoxin, TTX

講演番号：2F04-01
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 10:30～ ミーティングルーム F

ヒスチジン、ヒスタミンの水素重水素交換反応の検討

Hydrogen-deuterium exchange of histidine and histamine

○橋本 誠、タクリム ゼトリアナ　プテリ、杤木 真波 (北大農)
○Makoto Hashimoto, Zetryana Puteri Tachrim, Manami Hashinoki (Hokkaido Univ.)

当研究室では、芳香族アミノ酸を重水素化トリフルオロメタンスルホン酸 (TfOD)で処理することにより芳香環選択的な水素−重水素交換反応を達成し、この手法はペプチド中の芳香族アミノ酸 [1)]や光反応性アミノ酸誘導体 [2,3)]へも適用可能であることを明らかとしている。今回イミダゾール環を持つヒスチジン、ヒスタミンへの TfOD 処理による水素−重水素交換反応を検討した。

ヒスチジンを４℃で TfOD 処理したところ、イミダゾール環への重水素導入は認められなかった。室温、６０℃処理でも重水素の導入は認められず、１３０℃、6 時間処理条件でイミダゾール環に３０％前後の重水素導入が観察された。それと同時にアミノ酸α−位への重水素導入が同程度観察された。これら水素−重水素交換反応を長時間行うとα−位＞イミダゾール 5 位＞イミダゾール 2 位の順で交換反応が起こりやすい傾向が観察された。ヒスチジンの脱炭酸化合物であるヒスタミンではアミノ基α−位への重水素交換は観察されず、イミダゾール 5 位＞イミダゾール 2 位の順での重水素交換が認められた。

フェニルアラニン、チロシン共存下での TfOD 処理では、ヒスチジンへの重水素導入は認められず、フェニルアラニン、チロシン芳香環特異的な重水素導入が認められた。[4)]

Histidine and its decarboxylated metabolite, histamine, containing imidazole ring, play an important role for biological activity. Deuterated trifluoromethanesulfonic acid (TfOD) is one of the acid hydrogen-deuterium exchange reagents for aromatic compounds. Hydrogen-deuterium exchanges of histidine and histamine with TfOD were examined.

Ref) 1) Y. Murai, L. Wang, K. Masuda, Y. Sakihama, Y. Hashidoko, Y. Hatanaka, M. Hashimoto, Eur. J. Org. Chem., 5111-5116 (2013).
2) L. Wang, Y. Murai, T. Yoshida, M. Okamoto, K. Masuda, Y.Sakihama, Y. Hashidoko, Y. Hatanaka, M. Hashimoto, Biosci. Biotechnol. Biochem., 78, 1129-1134 (2014).
3) Z. P. Tachrim, S. Nakagawa, T. Nakamura, F. Ohashi, N. Kurokawa, H. Wakasa, Y. Tokoro, Y. Sakihama, Y. Hashidoko, T. Suzuki, M. Hashimoto, Heterocycles, 99, 404-414 (2019)
4) Z. P. Tachrim, N. Kurokawa, Y. Tokoro, M. Hashimoto, Heterocycles, 101, 357-362 (2020)

hydrogen-deuterium exchange, histidine, histamine

発表責任者：橋本　誠（hasimoto@abs.agr.hokudai.ac.jp）

講演番号：2F04-02
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 10:30～ ミーティングルーム F

ペプチド合成における phenylglycine の構造化学的特性の検討

Properies of phenylglycine in peptide synthesis

○石川 祥子、橋本 誠 (北大農)
○Shoko ISHIKAWA, Makoto Hashimoto (Hokkaido Univ.)

感染症の治療に用いられているβ-ラクタム系抗生物質の 1 種である ampiciline は、現在、酵素法で合成されている。しかし、ampiciline 骨格の一部であるアミノ酸 phenylglycine(Phg)はα位に直接ベンゼン環が結合しているため、ラセミ化が起こりやすく、また ampiciline 骨格の酸性条件での不安定性のため ampiciline 誘導体の化学的合成法がほとんど報告されていない。本研究では、ampiciline の化学的合成を可能にするため、Phg を用いて塩基性で脱保護可能な N-トリフルオロアセチル(TFA)保護ペプチド合成法の詳細を検討した。まず、N 末を TFA で保護した TFA-Phg-OH の C 末を *N*-ヒドロキシスクシンイミドを用いて活性化させ、ペプチド合成することを検討した。、合成した Phg の活性エステルと Ala-OMe･HCl を用いて TEA 存在下でペプチド合成したが、ラセミ化が確認された。そこで TFA-Phg-OH から直接ペプチド合成し、塩基を用いて脱保護することを検討した。TFA-Phg-OH と Ala-OMe･HCl を用いて WSCD･HCl,TEA 存在下でペプチド合成(TFA-Phg-Ala-OMe)を行うと、Phg の oxazole の生成を抑制しつつ、高収率かつラセミ化を抑制してペプチド合成可能であることが分かった。さらに TEA 添加方法、Ala-OMe･HCl の等量に関しても変更した。すべての TFA-Phg-Ala-OMe の立体異性体を合成することで NMR によりラセミ化を評価できることを明らかにした。続いて、合成した TFA-Phg-Ala-OMe に対し様々な塩基での脱保護を検討したところ、室温短時間で Phg の N 末 TFA 基と Ala の C 末 OMe が脱保護された 4 種の Phg-Ala を得ることに成功し、溶解性を利用して精製することが可能であった。

Phenylglycine (Phg) is unstable because a benzene ring directly attaches at the α-position of amino acid skeleton and is found in ampicilline, which is known as antibiotic and unstable acidic conditions. To establish chemical synthesis of ampiciline, peptide synthesis with Phg was studied to establish deprotected of protection group with alkaline conditions. *N*-terminal of Phg was protected by trifluoroacetyl group (TFA-Phg-OH) and the *C*-terminal was converted to succinimide ester. Racemization of Phg was observed with Ala-OMe･HCl. The peptide synthesis with TFA-Phg-OH and Ala-OMe･HCl with WSCD･HCl was subjected to suppress racemization. Finally, the dipeptide was deprotected at room temperature under alkaline conditions smoothly without loss of its chirality.

amino acid, peptide synthesis, chirality

発表責任者：石川祥子（0929infinite0210snsd@gmail.com）

講演番号：2F04-03
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 10:30～ ミーティングルーム F

光アフィニティーラベルを指向した(trifluoromethyldiazirinyl)phenylboronic acid 誘導体の新規合成法検討

Synthesis of (trifluoromethyldiazirinyl)phenylboronic acid derivatives for photoaffinity labeling

○杤木 真波、橋本 誠 (北海道大農)
○Manami HASHINOKI, Makoto HASHIMOTO (Hokkaido Univ.)

光アフィニティーラベルは低分子生理活性物質と生体分子間の構造的および機能的な相関を解析する化学生物学的手法の１つである。実際に、生理活性物質の構造中に光反応性基を導入した化合物を利用することで、タンパク質混合系から標的とするタンパク質のみをラベル化し、同定を行う。その結果、新規薬剤の開発や未知の植物ホルモン等の生理的な作用機構の解明が期待できる。この手法の光反応性基として phenyldiazirine や arylazide、benzophenone がよく利用される。これら３つ光反応性基のうち、carbene を発生させる phenyldiazirine は効率的にラベル化が可能であることが知られているが、三員環 trifluoromethyldiazirine 環の合成が複雑なため、生体分子研究における応用例は他に比べ多くない。本研究では、鈴木-宮浦カップリング、ホウ酸レセプターや糖-ホウ酸複合体の解析が可能な未だ知見のない３位及び４位に trifluoromethyldiazirinyl 基を導入した phenylboronic acid 誘導体の合成について検討を行った。

入手容易な 3-もしくは(4-formylphenyl)boronic acid 誘導体を出発原料とし、CF_3-$SiMe_3$との反応により(trifluorohydroxyethyl)boronic acid 誘導体を合成し、これを MnO_2 及び Dess-Martin で酸化し(trifluoroacethyl)boronic acid(TFA-Ph-B)誘導体へと変換した。この反応はグラムスケールでの調製も可能であった。TFA-Ph-B 誘導体は４ステップの oxime 化、tosyl 化、diaziridine 構築、酸化を経て、trifluoromethyldiazirine 環を構築することが出来た。最後に、ホウ酸部分の脱保護やイオン化を行い、初めて(trifluoromethyldiazirinyl)phenylboronic acid 誘導体の合成に成功した。

Photoaffinity labeling is a useful biochemical method in to elucidate structural and functional relationships between low molecular weight biologically active compounds and biomolecules. This method is suitable for the analysis of biological interactions as it is based on the affinity of bioactive compounds for biomolecules using various photophores. Trifluoromethylphenyldiazirine is one of the most reliable photophores for photoaffinity labeling during functional analysis of biologically active compounds. Phenylboronic acid derivatives containing trifluoromethyldiazirinyl moiety have not yet been reported. The construction of the photophore was achieved using (3-formylphenyl)boronic acid and (4-formylphenyl)boronic acid pinacol esters effectively.

Diazirine, Photoaffinity labeling, Phenylboronic acid

発表責任者：杤木　真波（manaaaami09@gmail.com）

講演番号：2F04-04
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 10:30～ ミーティングルーム F

クランベシン B メチルエステルの合成研究

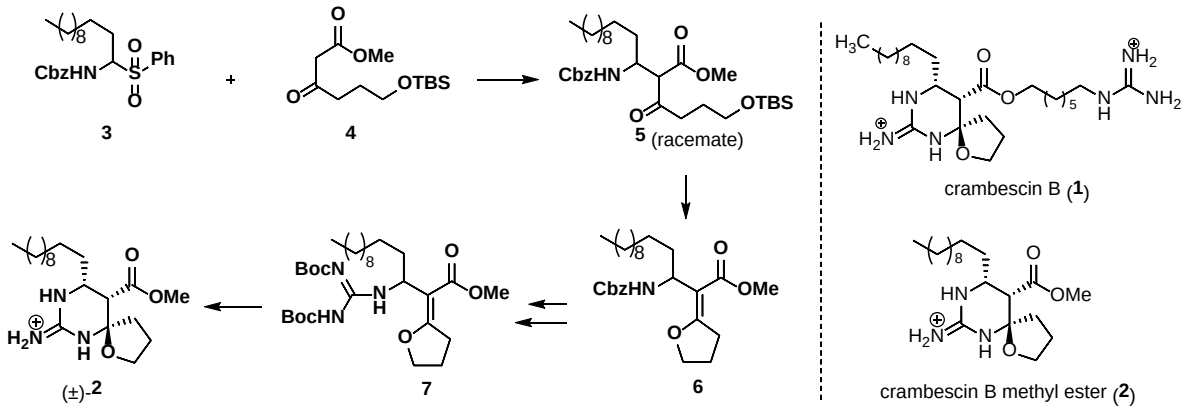
Synthetic studies on Crambescin B methyl ester

○丹台 剛太朗、中崎 敦夫、西川 俊夫 (名大院生命農)
○Kotaro Tandai, Atsuo Nakazaki, Toshio Nishikawa (Nagoya Univ.)

クランベシン B (**1**)は、Braekman らによって地中海に生息する海綿 *Crambe crambe* から単離された環状グアニジンアルカロイドである [1]。その後、Snider らによってラセミ全合成が報告された [2]。当研究室では、様々なクランベシン類の合成を行ってきたが、**1** の光学活性体の全合成には至っていない [3]。そこで本研究では、**1** の全合成に先立ち、モデル化合物であるクランベシン B メチルエステル (**2**) のラセミ体の合成を行ったのでそれについて報告する。

合成した **3** と **4** を Mannich 反応で連結し **5** とした。その後、THF 環を構築し **6** とした後に、グアニジン化を行い **7** とした。最後に、酸性条件下で Boc 基の脱保護に伴うスピロ環構築を行うことで **2** をジアステレオマー混合物として得た。本発表では、各変換の詳細について述べる。

Crambescin B (**1**), a cyclic guanidine alkaloid, was isolated from a Mediterranean sponge.[1] Total synthesis of racemic **1** has been reported by Snider and co-worker.[2] We have already synthesized an array of crambescin analogues expect for **1**.[3] As a preliminary of asymmetric synthesis of **1**, we started the synthesis of crambescin B methyl ester (**2**) through a new approach.



References

1. Berlinck, R. G. S.; Braekman, J. C.; Daloze, D.; Hallenga, K.; Ottinger, R. *Tetrahedron Lett*. **1990**, *31*, 6531.

2. Snider, B. B. *et al. J. Org. Chem*. **1993**, *58*, 3828.

3. (a) Nakazaki, A.; Ishikawa, Y.; Sawayama, Y.; Nishikawa, T. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 53. (b) Nakazaki, A.; Nakane, Y.; Isikawa, Y.; Yotsu-Yamashita, M; Nishikawa, T. *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14*, 5304.

guanidine alkaloid, spiro-aminal, total synthesis

講演番号：2F04-05
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 10:30～ ミーティングルーム F

アプリシアトキシン/オシラトキシン類縁体の合成

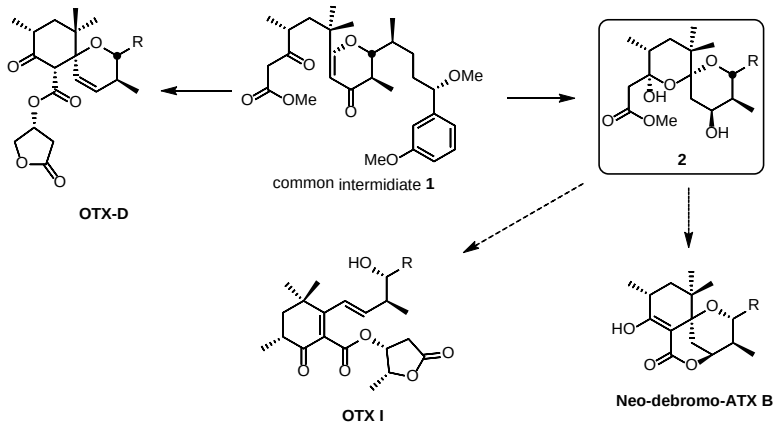
Synthetic studies on analogs of Aplysiatoxin and Oscillatoxin

○波田 航平、西川 俊夫、中崎 敦夫 (名大院生命農)
○Kohei HADA, Toshio NISHIKAWA, Atsuo NAKAZAKI (Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya Univ.)

アプリシアトキシン(ATX)は 1972 年に単離されて以降その生物活性や合成法についての研究が盛んにおこなわれてきており、最近では抗がん剤のシードとして注目されている。しかし多数発見されている ATX/OTX 類縁体については、単離された量が微量なこともあり詳しい生物活性についてはわかっていない。ATX/OTX 類縁体の合成法を確立することで、創薬や生命科学分野での本化合物群を用いた基礎研究の促進、応用研究の発展に貢献できると考え、本研究に着手した。

当研究室ではすでに類縁体の一種であるオシラトキシン-D (OTX-D)の合成に成功しており、その中間体 **1** を ATX/OTX 類合成の共通中間体 **1** として設定した。スピロアセタール環とマクロラクトン環を段階的に構築することで、類縁体のもつ多様な環構造を構築できると考えている。本発表では、共通中間体 **1** より合成したスピロアセタール **2** を起点として、いくつかの類縁体の環構造の構築に成功したのでその結果を報告する。

Since aplysiatoxin (ATX) was isolated in 1972, research on its biological activity and synthetic method has been actively conducted. However, many of the ATX / OTX analogs that have been discovered are not known for their biological activity. We started this research because we thought that establishing a method for synthesizing ATX / OTX analogs would contribute to the promotion of basic research in the fields of drug discovery and life science, and the development of applied research. Intermediate 1 used in the synthesis of oscillatoxin-D (OTX-D) in our laboratory was set as a common intermediate for ATX / OTX synthesis. By constructing the spiro acetal ring and the macrolactone ring in stages, we expect to be able to construct various ring structures of analogs. In this presentation, we have succeeded in constructing the ring structure of several analogs starting from spiro acetal 2 and report the results.



Neo-debromo-aplysiatoxin-B, Oscillatoxin-I, Total synthesis

講演番号：2F04-06
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 10:30～ ミーティングルーム F

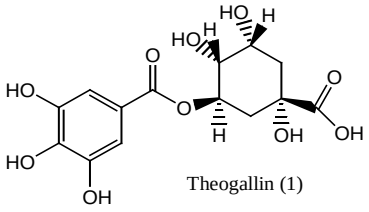
茶テオガリン及びその類縁体の高純度試薬の開発

Development of high purity reagents for tea theogallin and its analogs

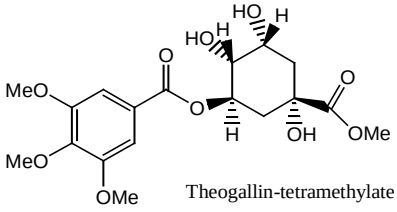
○森 拓哉、田村 敦裕、中塚 進一 (長良サイエンス株式会社)
○Takuya Mori, Atsuhiro Tamura, Shin-ichi Nakatsuka (Nagara Science Co. Ltd.)

【背景・目的】緑茶中の旨味成分としてテオガリンが知られているが、非常に水溶性が高く分離精製しにくいことが知られている[1)]。これらを逆相系 ODS カラムを用いて HPLC 分析をすると類似の構造とみられる化合物が沢山あり、これらが複雑に混合していることで抹茶等の味覚を構成していると思われる。そこで関連化合物を詳細に分離精製して研究を進めることにした。

【方法・結果】市販の茶抽出物を ODS 分析カラムを用いて分析すると、テオガリン類の近くには多くの類縁体化合物が存在した。そこでまずテオガリンの高純度標準品を作ることを目指し、HPLC 分析や NMR による機器分析で 99%純度のテオガリン標準品を作製に成功してその構造を証明した。テオガリンはキナ酸のモノガレート体であるが、その近辺には類縁体と思われる多くの化合物が検出されたので分離精製と構造解析を進めている。



Theogallin (1)



Theogallin-tetramethylate (2)

1） Shu Kaneko *et al.*, AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY, **54**, 2688-2694(2006)

【Background and purpose】 Theogalin-related compounds are known as umami components in green tea, but these are known to be very water-soluble and difficult to separate and purify. 1)

【Method/Result】When commercially available tea extracts were analyzed using ods analysis columns, there were many other analog compounds near the theogalins. Therefore, with the aim of first making a high purity standard product of theogalin, we succeeded in producing a 99% purity theogalin standard product by HPLC analysis and instrument analysis using NMR, and proved its structure. Theogalin is a monogalate of kinaic acid, but many compounds thought to be analogs have been detected in the vicinity, so these separation purification and structural analysis are advanced.

Theogallin, Polyphenol, Tea

発表責任者：中塚進一（nagara@nsgifu.jp）

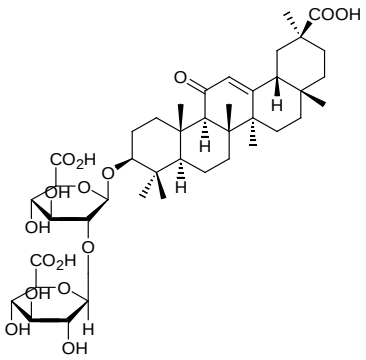
講演番号：2F04-07
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 10:30～ ミーティングルーム F

甘草グリチルリチン及びその類縁体の高純度試薬の開発

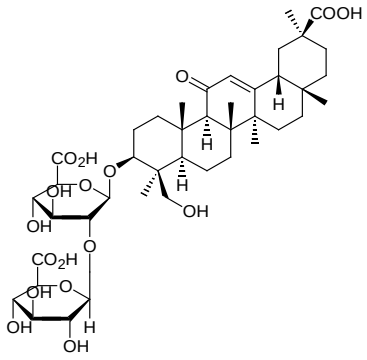
Development of high purity reagents for glycyrrhizin and its analogs

田村 敦裕、森 拓哉、○藤野 和孝、中塚 進一 (長良サイエンス株式会社)
Atsuhiro Tamura, Takuya Mori, ○Kazutaka Fujino, Shin-ichi Nakatsuka (Nagara Science Co. Ltd.)

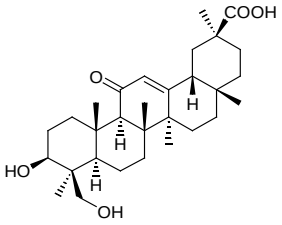
【背景・目的】グリチルリチン類は漢方薬の中でも代表的な生薬で、多くの類縁体が存在していることから、純粋な標準品を作製することが困難である。我々は、各類縁体の含量やそれらの混合比と薬理活性の関係について研究を進める目的で、各類縁体の高純度試薬の開発を目指した。
【方法・結果】Glycyrrhizin, Licoricesaponin G_2, Licoricesaponin H_2, それらのアグリコン及びそれらの 18α体等、合計 10 種類の類縁体を 98%(HPLC)以上の純度で精製できた。グリチルリチン類は、特に類縁体混合物を漢方薬として用いることが多いが、各類縁体の高純度試薬を開発できたことで、薬理活性の増強作用等についての研究に貢献できると考えている。



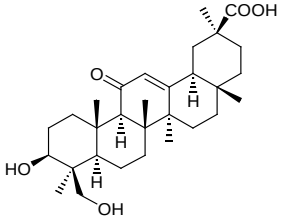
1) Glycyrrhizin



2) LicoricesaponinG2



3) 18β-24-hydroxyglycyrrhetinic acid



4) 18α-24-hydroxyglycyrrhetinic acid

Glycyrrhizin is a typical crude drug among many Chinese herbal medicines, and it is difficult to prepare a pure standard product due to the presence of many related compounds.As for glycyrrhizins, a mixture of analogs is often used as a Chinese herbal medicine, but this time, 10 kinds of constituents could be purified with 99% HPLC purity, although in a small amount.

Glycyrrhizin, Glycyrrhetinic acid, Licorice

発表責任者：中塚進一（nagara@nsgifu.jp）

講演番号：2F04-08
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 10:30～ ミーティングルーム F

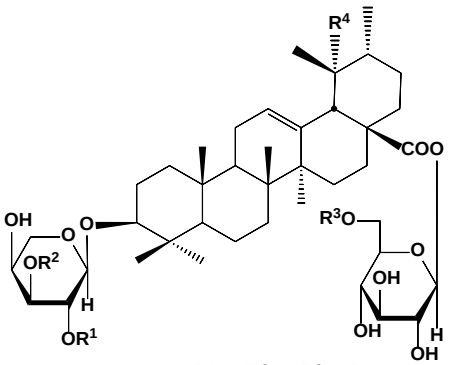
マテ葉部からの新規トリテルペンサポニンの単離および脂肪吸収抑制作用の評価

Triterpene saponins from *Ilex paraguariensis* leaves and evaluation of their antilipidemic activity

○徐 尹[1]、長友 暁史[1]、井上 尚樹[1]、今野 拓哉[1]、阪本 千夏[1]、曽根 万柚子[1]、柴坂 彩[1]、村岡 修[1,2]、二宮 清文[1,2]、吉川 雅之[1]、森川 敏生[1,2] ([1]近畿大薬総研、[2]近畿大アンチエイジングセ)
○YIN XU[1], Akifumi Nagatomo[1], Naoki Inoue[1], Takuya Konno[1], Chinatsu Sakamoto[1], Mayuko Sone[1], Aya Shibasaka[1], Osamu Muraoka[1,2], Kiyofumi Ninomiya[1,2], Masayuki Yoshikawa[1], Toshio Morikawa[1,2] ([1]Pharm. Res. Technol. Inst., Kindai Univ., [2]Antiaging Cent., Kindai Univ.)

モチノキ科植物マテは，ブラジルをはじめアルゼンチン，パラグアイなどの南米地域に分布する低木の常緑樹で，肥満の解消や美容などを目的に機能性飲料として広く利用されている．今回，我々はマテ葉部の MeOH 抽出エキスにマウスを用いたオリーブ油負荷試験において血中中性脂肪上昇抑制作用を見出したことから，詳細な成分探索を実施した．ブラジル産マテ乾燥葉部の MeOH 抽出エキスから，溶媒分配にて EtOAc 移行部および H_2O 移行部を得た．H_2O 移行部については Diaion HP-20 カラムで分画し，H_2O 溶出部および MeOH 溶出部を得た．これらのエキスまたはフラクションを経口投与した ddY 系雄性マウスにオリーブ油を投与し経時的に血中中性脂肪濃度を測定したところ，MeOH 抽出エキスに加えて EtOAc 移行部および MeOH 溶出部に血中中性脂肪上昇抑制作用が認められた．両フラクションを分離精製した結果，2 種の新規ウルサン型トリテルペンサポニンの MATE-1 (**1**) および MATE-2 (**2**) を単離・構造決定するとともに，29 種の既知化合物を単離・同定した．さらに，単離した化合物についてブタ膵リパーゼによる脂肪分解作用に対する阻害活性を測定したところ，matesaponin 1 (**3**) に強い活性が認められた．Matesaponin 1 (**3**) はマウスにおけるオリーブ油負荷試験においても有意な抑制作用を示したことから，血中中性脂肪上昇抑制作用はリパーゼ阻害活性によるものと推察された．

Aquifoliaceae plant *Ilex paraguariensis* (mate) is an evergreen shrub that is cultivated in South America such as Brazil, Argentina, and Paraguay. The leaves are widely used as functional beverages for the purpose of slimming. We have found the inhibitory activity of the MeOH extract from mate leaves, an EtOAc-layer partitioned from the MeOH extract, and a MeOH-eluate separated from a H_2O layer by Diaion HP-20 column on serum triglyceride (TG) elevation in olive oil-treated mice. From the EtOAc-layer and the MeOH-eluate, two new ursane-type triterpene saponins, MATE-1 (**1**) and MATE-2 (**2**) were isolated and structurally determined together with 29 known constituents. As a result of measuring the porcine pancreatic lipase inhibitory activity of isolated compounds, matesaponin 1 (**3**) was found to exhibit a potent activity. Compound **3** has significantly inhibited the serum TG elevation in olive oil-treated mice.



	R1	R2	R3	R4
MATE-1 (**1**)	Rha	Glc-Glc	H	OH
MATE-2 (**2**)	Ac	Glc	Glc	H
matesaponin 1 (**3**)	H	Glc	H	H

mate, pancreatic lipase, olive oil

発表責任者：森川敏生（morikawa@kindai.ac.jp）

講演番号：2F04-09
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 10:30～ ミーティングルーム F

トウビシのポリフェノール成分とその抗糖化作用

Polyphenols from *Trapa bispinosa* and their antiglycation activities

○早川 智紗[1]、鈴木 勝一[1]、岩岡 裕二[1]、上村 知広[2]、伊東 秀之[1]([1]岡山県立大保健福祉、[2]林兼産業株式会社)
○Chisa HAYAKAWA[1], Shoichi SUZUKI[1], Yuji IWAOKA[1], Tomohiro UEMURA[2], Hideyuki ITO[1] ([1]Okayama Prefectural Univ., [2]Hayashikane Sangyo Co., Ltd.)

トウビシ (*Trapa bispinosa*) の果皮エキスは血糖値上昇抑制作用や抗糖化作用を有することが報告されているが，その機能性成分に関してはほとんどが未特定である。そこで，本研究ではヒシエキスに含まれる抗糖化に寄与する成分の同定を行った。

ヒシエキスを各種有機溶媒により順次抽出後，各エキスについて Toyopearl HW-40C カラムクロマトグラフィー等により分離，精製を行った。各エキスおよび単離した化合物について，advanced glycation end-products (AGEs) 生成阻害作用と AGEs 前駆物質分解作用を測定することにより抗糖化作用の評価を行った。その結果，gallic acid, 2,6-di-*O*-galloyl-β-D-glucose, 1,2,3-, 1,2,6-および 2,3,6-tri-*O*-galloyl-β-D-glucose, 1,2,3,6-および 1,2,4,6-*O*-galloyl-β-D-glucose，tellimagrandin II, decarboxylated rugosin A, camptothin B, (7'*S*,8'*R*)-dihydrodehydrodiconiferyl alcohol-9'-*O*-β-D-glucoside, rubuphenol および eschweilenol A の 13 種のポリフェノールを同定した。次に単離した化合物の AGEs 生成阻害作用と AGEs 前駆物質分解作用を評価した結果，ほとんどの化合物に陽性対照よりも顕著な生成阻害および分解作用が認められた。

以上の結果から，本研究においてヒシエキスより抗糖化成分として各種ポリフェノールを同定し，ヒシエキスの抗糖化素材としての有用性を示す基礎データを提示することができた。

The extract of the skins from *Trapa bispinosa* has been reported to show reducing effects of blood glucose levels and antiglycation effects. We herein investigated the identification of antiglycative ingredients in the skins of *T. bispinosa*.

The skin powder of *T. bispinosa* was extracted with Et_2O, EtOAc, and *n*-BuOH, to afford the respective extract. These extracts were separated by several column chromatographies, to give gallic acid, 2,6-di-*O*-galloyl-β-D-glucose, 1,2,3-, 1,2,6- and 2,3,6-tri-*O*-galloyl-β-D-glucoses, 1,2,3,6- and 1,2,4,6-*O*-galloyl-β-D-glucoses, tellimagrandin II, decarboxylated rugosin A, camptothin B, (7'*S*,8'*R*)-dihydrodehydrodiconiferyl alcohol-9'-*O*-β-D-glucoside, rubuphenol, and eschweilenol A.

The isolated compounds were evaluated for inhibitory effects toward the formation of AGEs and crosslink-cleaving activities. The inhibitory effects of the hydrolyzable tannins among the tested compounds were shown more potent than that of aminoguanidine as a positive control.

These findings suggest that the tannins may contribute to the antiglycation effects of *T. bispinosa*.

Trapa bispinosa, Tannin, Antiglycation

講演番号：2F04-10
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 10:30～ ミーティングルーム F

アカエゾマツ精油香気の網羅的解明と未知成分の単離

A comprehensive analysis of *Picea glehnii* essential oil

○平間 智速、妙田 貴生、野島 聡（東農大生物産業）
○chihaya hirama, takao myouda, satoshi nojima (Tokyo Univ. of Agriculture)

【目的・背景】アカエゾマツ（*Picea glehnii*）は、マツ科トウヒ属の常緑針葉樹で主に北海道に分布している。葉や枝から製造されるエッセンシャルオイルは、心地よい香気を持ち人気が高い。一方、アカエゾマツ精油中の揮発性成分は黄色ブドウ球菌等の細菌類に対する強い抗菌活性を持つと報告されている。しかしながら、精油成分に関する詳細な報告はほとんどない。本研究では精油香気成分の網羅的な解析を行った。
【方法・結果】アカエゾマツのから採取した精油成分をまず順相 HPLC（Hexane-Ethanol）にて極性ごとに分画し、GC-O(GC-Olfactometry)、GC-MS 分析に供し 58 の成分を確認した。主要成分は bornyl acetate、α-pinene、limonene であった。確認された 58 成分の内 41 成分（重量の 65%）は炭化水素類で、49 成分（重量の 70%）は C10 もしくは C15 のテルペノイドであった。GC-嗅覚計による匂い嗅ぎ分析では、pine 様や camphor 様、woody 様など特徴的な炭化水素香気が多くみられた。ほとんどが既知成分と特定されたが、MS データベースで確認できない成分が幾つか確認された。これらのうち、～0.15%程度と比較的含有量の多い成分に関して、大量注入（数百μℓ／回）と高精度高回収率の分取が可能な分取 GC で高純度かつ大量に単離し、1D,2DNMR に供し構造解析を行なった。

Picea glehnii (Coniferae: Pinaceae) mostly distributes in northern Japan, Hokkaido. Its essential oil has favorable conifer and woody aromas, and thus it is widely used as a fragrance. On the other hands, it's been reported that the essential oil exhibits a strong antibacterial activity against, such as *S. aureus*. However, there have been few studies on the components of the aroma oil. In this study, we conducted a comprehensive analysis of the volatile components of *P. glehnii* essential oil. The oil was first fractionated and partially purified with HPLC, and then the fractions were subjected to GC-Olfactometry and GC-MS analyses. Fifty eight components were detected in total, and most of them were elucidated hydrocarbon-terpenoids. A few of them showed a low mass database matching. Of these, a compound with a relatively high content about 0.15% of the essential oil, was isolated by a high performance preparative GC equipped with a large-volume injection system (several hundred μℓ/injection). The isolated compound was subjected to 1D and 2D NMR analyses for structural elucidation. The results are discussed.

Picea glehnii, terpenoids, essential oil

講演番号：2F04-11
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 10:30～ ミーティングルーム F

高知県産ミソハギ（*Lythrum anceps*）に含まれるリパーゼ阻害活性物質の単離と同定

Isolation and identification of the lipase inhibitors in Misohagi (*Lythrum anceps*) from Kochi Prefecture.

○柳田 景亮[1]、柏木 丈拡[1]、鈴木 大進[2]、岡﨑 由佳[3]、金 哲史[1]、川北 浩久[2]、篠原 速都[3]、渡邊 浩幸[4]、水上 元[5]（[1]高知大農、[2]高知県海洋深層水研究所、[3]高知県工業技術センター、[4]高知県立大健栄、[5]高知県立牧野植物園）

○Keisuke YANAGIDA[1], Takehiro KASHIWAGI[1], Osamu SUZUKI[2], Yuka OKAZAKI[3], Chul-sa KIM[1], Hirohisa KAWAKITA[2], Hayato SHINOHARA[3], Hiroyuki WATANABE[4], Hajime MIZUKAMI[5] ([1]Kochi Univ., [2]Kochi Prefectural Ocean deep sea water research institute, [3]Industrial Technology Center of Kochi Prefecture, [4]Univ. of Kochi, [5]The Kochi Prefectural Makino Botanical Garden)

肥満症は生活習慣病を引き起こす大きな因子であることが知られており、世界的に社会問題となっている。 その肥満の原因の一つに、食事からの脂肪 (トリグリセリド: TG) の過剰摂取による摂取カロリーの過多がある。これを防ぐ一つの方法として、膵リパーゼの活性を阻害することが挙げられる。これにより、消化管における TG の分解及び吸収の抑制、ひいては肥満症の予防と改善に繋がると考えられている。本研究では、リパーゼ阻害活性を示す高知県産未利用植物から活性物質を単離、同定することを目的とした。

ミソハギ (*Lythrum anceps*)の地上部を 80%MeOH で抽出、乾固し抽出サンプルを得た。抽出サンプルを液液分配、ODS 中圧カラムクロマトグラフィー、HPLC にて順次分画を行った。各分画物 (50 mg eq./mL)の膵リパーゼ阻害活性はリパーゼキット S (SB バイオサイエンス製)を用いて 412 nm における吸光度を測定し阻害率 (%)を算出した。強い活性を示すミソハギ MeOH 抽出物 (79.8%)の液液分配により、水層 (64.8%)に強い阻害活性が局在することが明らかになった。水層を ODS 中圧カラムクロマトグラフィーにて分画後、20% MeOH/H_2O 画分 (51.1%)のみが強い阻害活性を示した。20% MeOH/H_2O 画分を逆相 HPLC に供して分画を行い活性に関与する化合物 **1** 、**2** 及び **3** を単離した。化合物 **1** は単独で活性を示すが、化合物 **2**、**3** の共存により活性が大幅に増強されることが判明した。このことから、我々は化合物 **1**、**2**、**3** が相乗的に阻害活性を示していると考察している。化合物 **1**、**2**、**3** においては、NMR 及び LC-MS にて現在構造決定を進めている。

Obesity is a global health problem, because this symptom is a serious risk factor such as hypertension diabetic and arteriosclerosis. We found that a methanol extract of *Lythrum anceps*, which grows naturally in Kochi prefecture, strongly inhibits lipase, an enzyme involved in digestion of fat, which is one of the causes of obesity.

Three compounds **1**, **2** and **3** were isolated from this plant as active ingredients. Compound **1** alone showed weak lipase inhibitory activity. In addition, mixing of the three compounds significantly enhanced the activity of compound **1**. The structure of these active compounds is being determined.

lipase inhibitor, Lythrum anceps, obesity

発表責任者：柏木丈拡（tkashi@kochi-u.ac.jp）

講演番号：2F04-12
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 10:30～ ミーティングルーム F

結核菌由来 *E*型イソプレニル二リン酸合成酵素の機能解析

Functional analysis of *E*-isoprenyl diphosphate synthases from *Mycobacterium tuberculosis*

○阿部 透、上田 大次郎、佐藤 努（新潟大院自然）
○Tohru ABE, Daijiro UEDA, Tsutomu SATO (Niigata Univ.)

イソプレノイドは呼吸鎖キノンや糖キャリア脂質、生体膜構成成分などとしてすべての生物において必須の働きを果たしている。イソプレノイドの基本骨格は、C_5イソプレン単位間の縮合反応を触媒するイソプレニル二リン酸合成酵素（IDS）により形成される。IDS は形成する二重結合の幾何異性により *E*-IDS と *Z*-IDS に大別され、一次・三次構造の類似性がない別ファミリー酵素である。

最近私たちは非病原性抗酸菌から 3 種の *E*-IDS（GPP/FPP/GGPP [*E*-C_{10-20}]合成酵素：*E*-IDS1、solanesyl diphosphate [*E*-C_{45}]合成酵素：*E*-IDS2、*E*-C_{20} 合成酵素：*E*-IDS3）を同定した [1,2]。特に、*E*-IDS1 は中間体の *E*-C_{10} を伸長の途中で放出することを下流酵素 *Z*-IDS との混合反応系によって証明することができた [1,2]。系統解析により、結核菌において *E*-IDS1 と *E*-IDS2 に近縁なホモログは各々Rv2173 と Rv0562 であることが示されたが、Rv0562 は *E*-C_{20} 合成酵素であることが報告されており、*E*-IDS2 の機能と矛盾していた。また、Rv2173 は明確な機能が同定されていなかった。

本研究では Rv0562 と Rv2173 の再解析を行った。その結果、Rv0562 は *E*-IDS2 と同様に *E*-C_{45} 合成酵素であることが判明し、報告されている機能ではないことが新たに分かった。ゲノムにおいてメナキノン生合成遺伝子とクラスターを組んでいることも我々の同定を支持している。また、Rv2173 は *E*-IDS1 と同様に *Z*-IDS との混合反応系によって、C_{50} 糖キャリア脂質前駆体の *E*-C_{10} を反応途中で放出する *E*-C_{15} 合成酵素であることが明らかになった。Rv0562 と Rv2173 は各々生育必須なメナキノン-9 と C_{50} 糖キャリア脂質の生合成に関与すると考えられ、抗結核薬の新たなターゲットとなる可能性がある。

1) T. Abe *et al.*, *ChemBioChem*, 2020, 21, 2931. 2) 阿部ら, 農芸化学会 2019, 1D2a03.

Four *E*-IDSs and two *Z*-IDSs have been identified in pathogenic *Mycobacterium tuberculosis*. Recently, we identified three *E*-IDSs from nonpathogenic *Mycobacterium* species. However, the function of two *E*-IDSs (*E*-IDS1: *E*-$C_{10–20}$ synthase; *E*-IDS2: *E*-C_{45} synthase) from nonpathogenic species differed from those of the closely related homologs (Rv2173 and Rv0562) from *M. tuberculosis*.

In this study, re-analysis of Rv0562 and Rv2173 demonstrated that their functions were similar to those of *E*-IDS1 and *E*-IDS2 (Rv2173: *E*-$C_{10–15}$ synthase; Rv0562: *E*-C_{45} synthase). The newly proposed functions of Rv0562 and Rv2173 would be in the biosynthesis of menaquinone and glycosyl carrier lipids essential for growth.

isoprenoid, isoprenyl diphosphate synthase, mycobacterium

発表責任者：佐藤 努（satot@agr.niigata-u.ac.jp）

講演番号：2F04-13
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 10:30～ ミーティングルーム F

クラス IB テルペン合成酵素の環状構造形成機構の解析

Analysis of cyclic structure formation mechanism of class IB terpene synthase

○浅田 和也[1]、上田 大次郎[1]、三木 邦夫[2]、藤橋 雅宏[2]、品田 哲郎[3]、佐藤 努[1] ([1]新潟大院自然、[2]京大院理、[3]阪市大院理)
○Kazuya ASADA[1], Daijiro UEDA[1], Kunio MIKI[2], Masahiro FUJIHASHI[2], Tetsuro SHINADA[3], Tsutomu SATO[1] ([1]Niigata Univ, [2]Kyoto Univ, [3]Osaka City Univ)

テルペン合成酵素は開始反応の様式（二リン酸の脱離と二重結合のプロトン化）とそれを触媒する活性部位モチーフの違いによって、各々クラスIとIIに長年分類されてきた。一方、我々は開始反応がクラスI型にもかかわらず、クラスIの一次構造と類似性がないラージテルペン（C_{25}～C_{35}）合成酵素を *Bacillus* 属細菌から見出してきた[1-3]。また、立体構造はクラスIと類似していることを示すとともに、既存のモチーフとは異なるアスパラギン酸リッチモチーフを活性部位として同定した[4]。我々は、このファミリーの酵素をクラスIB と命名している[4]。

クラスIB の中には、環状と非環状生成物を生合成するものの２種類が知られているが、その触媒機構の違いに関してはあまりよく分かっていない[1-4]。最近、我々は *Bacillus alcalophilus* 由来のクラスIB テルペン合成酵素（BalTS）が、主生成物の非環状化合物だけでなく、環状化合物もマイナー生成物として形成することを明らかにした[5]。

本研究では、BalTS の X 線結晶構造解析において基質アナログ近傍に位置するアミノ酸残基に変異を導入して、酵素活性を解析した。その結果、環状構造形成に重要な残基を見出すことができたので報告する。また、重水素化基質を用いて環状構造形成の機構を解析したので合わせて報告する予定である。

1) Sato, T., *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 2011, 133, 9734-9737. 2) Sato, T., *et al.*, *ChemBioChem*, 2013, 14, 822-825. 3) Ueda, D., *et al.*, *ChemBioChem*, 2015, 16, 1371-1377. 4) Fujihashi, M., *et al.*, *Chem. Sci.*, 2018, 9, 3754–3758. 5) Stepanova, R., *et al.*, 農芸化学会 2020, 4B05a04.

Recently, we have shown that Class IB terpene synthase (BalTS) from *Bacillus alcalophilus* forms a cyclic compound as minor products as well as an acyclic compound of the main product. In this presentation, we analyzed the enzyme activity by introducing mutations into amino acid residues located near the substrate analog in the X-ray crystal structure analysis of BalTS. As a result, we were able to find residues important for the formation of cyclic structures. In addition, the mechanism of cyclic structure formation was analyzed using a deuterated substrate.

terpene, terpene synthase, isoprenoid

発表責任者：佐藤努（satot@agr.niigata-u.ac.jp）

講演番号：2F04-14
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 10:30～ ミーティングルーム F

酵素合成したアンブレインの龍涎香香気成分への変換と薬理活性解析

Conversion of enzyme-synthesized ambrein to aroma components and pharmacological activity of ambrein

川越 幸奈[1]、上田 大次郎[1]、柿原 嘉人[2]、原 崇[1]、○佐藤 努[1]（[1]新潟大院自然、[2]新潟大歯）
Yukina KAWAGOE[1], Daijiro UEDA[1], Yoshito KAKIHARA[2], Takashi HARA[1], ○Tsutomu SATO[1]
([1]Niigata Univ., [2]Niigata Univ. Dent.)

マッコウクジラの代謝産物である龍涎香は、古くから香料や漢方薬・伝統薬として利用されてきたが、現在ではほとんど入手できない。龍涎香の香り成分は、主成分であるアンブレインの光酸化分解から生じる。また、龍涎香の薬理活性は、アンブレインに起因すると考えられる。しかし、アンブレインおよび香り化合物への効率的な変換は達成されていない。そのような背景の中、我々はアンブレインの効率的な酵素合成法を開発してきた[1-3]。今回、合成したアンブレインを用いて行った、香気成分の変換と薬理活性解析について詳しく報告する。

アンブレインから龍涎香の香気成分への効率的な光酸化変換系を確立した。香気成分の収率は、既知の方法や天然の龍涎香の約 8～15 倍であった。光増感剤の種類によって、香り成分の比率が異なっており、反応条件によって人工龍涎香の香りを変えることができることが示唆された。

アンブレインの薬理活性については、まず、骨細胞の分化促進活性を解析した。骨芽細胞に対する活性を検出できなかったが、破骨細胞に対して濃度依存的な活性を見出すことができた。さらに、アミロイドβ誘導性神経細胞死の抑制活性も見出した。今後、骨代謝改善とアルツハイマー病予防に働く薬剤の開発につながる可能性がある。

1) Ueda, D., *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 2013, 135, 18335-18338.
2) Sato, T., *et al.*, *WO2017150695A1* (2017).
3) Yamabe Y, *et al.*, *Sci. Rep.*, 2020, 10(1), 19643.

Ambergris, a sperm whale metabolite, has long been used as a fragrance and traditional medication, but it is now rarely available. The odor components of ambergris result from the photooxidative degradation of the major component, ambrein. The pharmacological activities of ambergris have also been attributed to ambrein. However, efficient production of ambrein and odor compounds has not been achieved. Here, we constructed a system for the synthesis of odor components. First, an efficient photooxidative conversion system from ambrein to a range of volatiles of ambergris was established. The yield of volatiles was 8–15 %. Next, two biological activities, promotion of osteoclast differentiation and prevention of amyloid β-induced apoptosis, were discovered using the synthesized ambrein.

fragrance, pharmacological activity, triterpene

発表責任者：佐藤努（satot@agr.niigata-u.ac.jp）

講演番号：2F04-15
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 10:30～ ミーティングルーム F

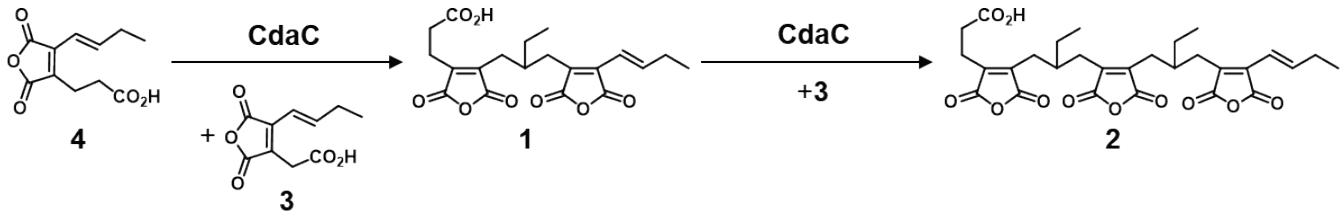
酸無水物多量体 Cordyanhydride の生合成研究（2）

Biosynthetic study on Fungal Maleic Anhydride "Cordyanhydride" (2)

○江口 桃香、長嶺 翔太、尾﨑 太郎、劉 成偉、南 篤志、及川 英秋（北大院理）
○ MOMOKA EGUCHI, SHOTA NAGAMINE, TARO OZAKI, CHENGWEI LIU, ATSUSHI MINAMI, HIDEAKI OIKAWA (Hokkaido Univ.)

糸状菌 *Cordyceps pseudomilitaris* BCC1620 より単離された cordyanhydride A (**1**,CDA) 及び B (**2**) は、無水マレイン酸型モノマーを基本単位とした多量体構造を有する。我々は CDA 生産菌のゲノム解析を行い、アルキルクエン酸合成酵素（ACS）やアルキルクエン酸脱水酵素（ACDH）のホモログを含む推定生合成遺伝子クラスターを同定した。この遺伝子情報に基づき、オリゴマー化酵素と予想した CdaC を麹菌宿主で異種発現し、monomer A (**3**) 及び homo-A (**4**) の微生物変換を試みた。その結果、**1** および **2** の生成を確認し、CdaC がオリゴマー化酵素であることを明らかにした。他の酸無水物天然物の二量化反応には、ketosteroid isomerase(KI) 及び phosphotidylethanolamine 結合タンパク質 (PEBP)のホモログが関与することが提唱されているが、今回は KI のみで二量化が進行したので、同ファミリーにおいて初めての例となった。モノマーの炭素鎖長やオリゴマー化の様式が異なる類縁体が多く知られており、今回最もシンプルなオリゴマー化反応を明らかにしたことで、一連の化合物に関して系統的な解析が可能になると期待される。

Cordyanhydrides A (**1**) and B (**2**) are secondary metabolites produced by *Cordyceps pseudomilitaris* BCC 1620. **1** and **2** have unique oligomeric structures consisting of maleic anhydride moiety as a common building block. In this study, we analyzed the genome sequence of the producing strain and identified the putative biosynthetic gene cluster. Based on this genetic information, the putative oligomerization enzyme CdaC was heterologously expressed in *Asperigillus oryzae*. As a result of bioconversion of monomer A (**3**) and homo-A (**4**), compounds **1** and **2** were produced, showing that CdaC catalyzed expected oligomerization. The dimerization reaction of other maleic anhydrides has been proposed to involve the homologues of ketosteroid isomerase (KI) and phosphotidylethanolamine binding protein (PEBP). This is the first case of dimerization by only KI in the family. The present study identified the simplest oligomerization among related maleic anhydrides and paves the way for systematic analysis of this enigmatic reaction.



Biosynthesis, filamentous fungi, anhydride

発表責任者：及川英秋（hoik@sci.hokudai.ac.jp）

講演番号：2F04-16
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 10:30～ ミーティングルーム F

コレステロール生合成阻害剤 phomoidride B の生合成研究 (2)

Studies on the Biosynthesis of Phomoidride B (2)

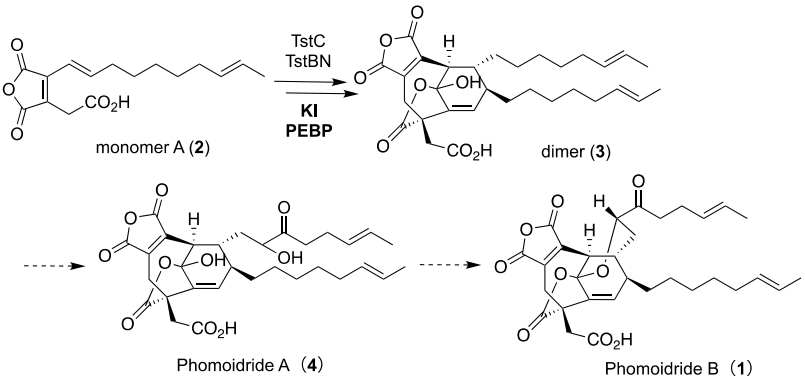
○山本 真太郎[1]、尾﨑 太郎[1]、劉 成偉[1]、丸山 潤一[2]、南 篤志[1]、及川 英秋[1] ([1]北大院理、[2]東大院農生科)

○ Shintaro YAMAMOTO[1], Taro OZAKI[1], Chengwei LIU[1], Jun-ichi MARUYAMA[2], Atsushi MINAMI[1], Hideaki OIKAWA[1] ([1]Hokkaido Univ., [2]The Univ. of Tokyo)

Phomoidride B (**1**) は、糸状菌 ATCC74256 株より単離された二次代謝産物であり、Ras ファルネシル化酵素やスクアレン合成酵素を阻害することから、抗癌剤や抗高脂血症薬のリードとして期待されている。標識化合物を用いた先行実験の結果から、**1** は無水マレイン酸型モノマーの二量化により生合成されると考えられるが、その詳細は未解明である。糸状菌代謝産物には同様の酸無水物多量体が知られているが、**1** は他の類縁体にはない多環式骨格を有しており、我々はその骨格構築機構に興味を持ち研究を進めてきた。これまでに、**1** の生合成遺伝子クラスター（*phi* クラスター）及び、それと相同性を示す *tst* クラスターを、生産菌と *Talaromyces stipitatus* からそれぞれ同定し、モノマー（**2**）の生合成経路を明らかにした。[1]

本研究では、CRISPR/Cas9 システムを用いたゲノム編集技術（Hot spot knock-in 法[2]）を利用し、汎用宿主である麹菌内での **1** の生合成経路再構築を試みた。初めに、麹菌 NSPlD1 株を宿主としてモノマー生合成遺伝子群を異種発現することで、**2** の脱炭酸体を生産する形質転換体 AO-*tstAJIM* を得た。次に、このモノマー生産株において二量化酵素遺伝子[3,4]と予想した *tstBCN* を共発現したところ、得られた形質転換体が二量体 **3** を生産することを確認した。さらに、**3** の生産株で酸化酵素 TstK を共発現したところ、**4** と予想される酸化生成物が観測された。生合成経路の全容解明を目指して、新たな生成物の構造解析や **1** への変換を試みており、その詳細を報告する。

Phomoidride B (**1**) is a secondary metabolite produced by an unidentified fungus ATCC74256 and known as an antihypercholesterolemic agent. 1 has a unique polycyclic structure possibly synthesized by the dimerization of maleic anhydride monomers. Previously, we identified the biosynthetic gene cluster for **1** and revealed the biosynthetic pathway of the monomer **2**. In this study, we examined the dimerization of **2** and characterization of the modification enzymes employing the *Aspergillus oryzae* expression system and CRISPR/Cas9-based genome editing.



1) R. Fujii, *et. al., Org. Lett.* **2015**, 17, 5658-5661
2) C. Liu, *et. al., J. Am. Chem. Soc.* **2019**, 141, 15519-15523
3) R. J. Cox, *et. al., Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, 55, 6784-6788
4) T. Shiina, *et al., Org. Lett*. **2020**, 22, 5, 1997-2001

Biosynthesis, Anhydride, Heterologous expression

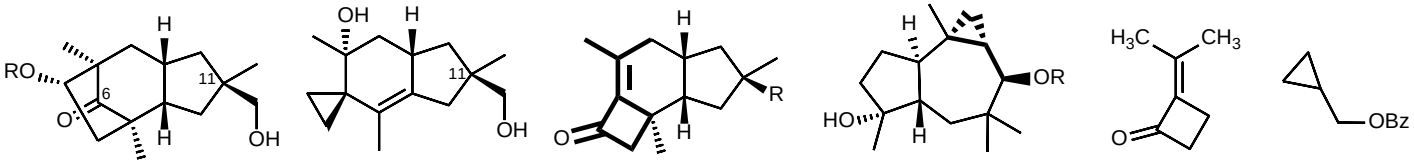
講演番号：2F07-01
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 13:30～ ミーティングルーム F

チャカイガラタケの生産する新規シクロフムラノイドの単離・構造決定

Cyclohumulanoides isolated from Daedaleopsis Tricolor

○橋本 勝[1]、猪瀬 航太[1]、西山 真未[1]、殿内 暁夫[1]、紺野 勝弘[2]、白濱 晴久[3]([1]弘前大農生、[2]富山大学和漢研、[3]北海道大学)
○ Masaru Hashimoto[1], Kota Inose[1], Mami Nishiyama[1], Akio Tonouchi[1], Katsuhiro Konno[2], Haruhisa Shirahama[3] ([1]Hirosaki Univ., [2]Toyama Univ., [3]Hokkaido Univ.)

チャカイガラタケ(*Daedaleopsis Tricolor*)培養液より 5 種の新規シクロフムラノイドを単離し、構造を決定した。さらに DFT 法により ^{1}H 及び ^{13}C 化学シフトを計算、実験値と比較することによりその構造を確認した。化合物 **1-5** の 11 位相対配置については、^{13}C-化学シフトより ^{1}H-化学シフトの方がより明確に区別できることが判明した。**1**, **2** は真壁らがムラサキ-イロガワリハツから単離した repraesentin 類の 11-エピ誘導体である。絶対配置について、円二色性スペクトルにより検討した。**1** では 300 nm に 6 位カルボニル基 $n\rightarrow\pi^*$に由来する負のコットン効果を観測した。オクタント則により下記の絶対配置と予想、さらに DFT 計算によりスペクトルを再現して確認した。我々は DFT 計算をブラックボックスにすることなく、従来のスペクトル帰属を補足する手段にすべきと考えている。**7, 8** は天然物 **5**, **6** の太線で示した部分を抽出した仮想モデルである。**7**, **8** の立体配座を天然物 **5**, **6** の安定配座と同じくして計算すると、天然物の ECD スペクトルをほぼ再現した。このことから天然物 **4**, **5** の CD スペクトルでは∠O=C-C=C の捩れが、**6** ではシクロプロパンのπ性がベンゾイル基と相互作用が反映されていることを明らかにした。



1 : R=H,
2 : R=OH,

3: illudine-DT

4: R = CO_2H
5: R = CH_2OH

6: R = H
6': R = Bz

7

8

Five novel cyclohumulanoides were isolated from *Daedaleopsis Tricolor,* and their structures were elucidated. Compounds **1**, **2** are C-11 isomers of repraesentins reported by Makabe. The structures of new compounds **1**-**5** were confirmed by comparing experimental ^{1}H and ^{13}C chemical shifts with those based on DFT calculations. It was found that ^{1}H signal distinguishes more clearly than ^{13}C signal for the discussion of C-11 configuration. The absolute configurations of **1**-**5** were studied by ECD spectra. Interestingly models **7** and **8** reproduced the ECD spectra of **5** and **6**, respectively, by adjusting the geometry. These revealed that the main Cotton effects observed in **5** and **6** were due to chiral torsion of ∠O=C-C=C and interaction between the π character of the cyclopentane ring and the benzoate, respectively.

cyclohumulanoides, DFT calculation, absolute configuration

発表責任者：橋本勝（hmasaru@hirosaki-u.ac.jp）

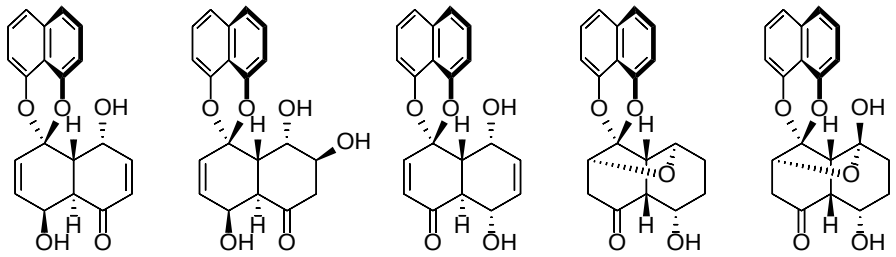
講演番号：2F07-02
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 13:30～ ミーティングルーム F

Phaeoseptum sp.が産生するスピロナフタレン誘導体

Spironaphthalene derivatives from *Phaeoseptum* sp.

○金原 龍飛、早坂 絢音、猪瀬 航太、三浦 聖美、岡村 毅、田中 和明、橋本 勝（弘前大農生）
○Ryuhi KANEHARA, Ayane HAYASAKA, Kota INOSE, Satomi MIURA, Takeshi OKAMURA, Kazuaki TANAKA, Msaru HASHIMOTO（Ｈｉｒｏｓａｋｉ Univ.）

糸状菌の生産する二次代謝物探索研究において、*Phaeoseptum* sp. KT4106 培養液より、5-dehydrodecaspiron F (**1**)および 5-dehydrodecaspiron H (**2**)を単離した。**1**-**2** の構造は NMR スペクトル解析などにより決定した。興味深いことに、**1** は等量の decaspiron A (**3**)が存在すると結晶性が著しく増大した。また、同培養液より既知化合物 palumarumycin CP_{4a} (**4**)及び CP_5 (**5**)も単離した。これらサンプルの旋光度は文献値と良い一致を示した（Krohn, K. *et al*., *Tetrahedron* **1997,** *53* (9), 3101）。**4** は **5** の 8 位 deoxy 誘導体である。Krohn らは、**4**, **5** は互いに異なった ECD スペクトルを与え、8 位を除き鏡像の関係にあると報告した。しかし、構造の類似性を考慮すると両者のスペクトルは酷似して然るべきであ。今回、我々が ECD を測定したところ、**4**, **5** ともに 230 nm に正のコットン効果を示す似通った ECD スペクトルを与えることが判明した。DFT 計算を用いた解析の結果、**4**, **5** いずれも(2*S*)-異性体であると結論した。本結論は生合成的にも合理的である。Krohn らも半経験分子軌道法（CNDO/S）によりスペクトルを解析しているが、20 年間の計算手法の進歩が今回の絶対配置訂正につながった。



1 **2** **3** **4** **5**

Filamentous fungus *Phaeoseptum* sp. KT4106 afforded novel spironaphtalenes **1** and **2** along with known derivatives **3**-**5**. The relative structures of **1** and **2** were determined by NMR spectroscopic analyses. Interestingly, **1** readily solidified when equal amounts of decaspiron A (**3**) existed. The fungus also produced known palumarumycin CP4a (**4**) and CP5 (**5**). Although Krohn et al reported that these provided different profiled ECD spectra each other, present study revealed these give resembled ECD spectra. DFT based analysis suggested that both **4** and **5** possess (2*S*)-configuration.

Spironaphthalene derivatives, ECD spectrum, DFT calculation

発表責任者：橋本勝（hmasaru@hirosaki-u.ac.jp）

講演番号：2F07-03
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 13:30～ ミーティングルーム F

放線菌が生産する熱ショック代謝物のケミカルバイオロジー

Chemical biology of heat shock metabolites produced by *Streptomyces*

○齋藤 駿[1]、加藤 航[1]、井本 正哉[2]、荒井 緑[1] ([1]慶應大理工、[2]順天堂大医)
○Shun SAITO[1], Wataru KATO[1], Masaya IMOTO[2], Midori ARAI[1] ([1]Keio Univ., [2]Juntendo Univ.)

＜日本語＞

我々は、「放線菌」を高温で培養すると、高温培養特異的物質が生産される現象を見出し、このような代謝物を「**熱ショック代謝物（Heat Shock Metabolite：HSM)**」と命名した (Saito, S. *et al*, *J. Antibiot.*, 2020)。これまで、HSM の単離・構造解析を試みたところ、微生物ホルモン SCB1 やアングサイクリン類、いくつかの新規化合物の獲得にも成功し、2017・2018 年度の本大会において報告してきた。一方、化合物添加及び生合成遺伝子の破壊実験による機能解析を試みたところ、これら HSM の中には「高温耐性」を担う物質が存在することが分かってきた。実際、微生物ホルモン SCB1 やアングサイクリン類が、他の HSM の生産や高温耐性に関与することが分かってきた。本研究では、HSM 生産現象の分子基盤の解明を目指し、HSM の単離・構造解析を継続するとともに、HSM の生産機構や生理的意義の解析研究を展開している。本大会では、日本の土壌より分離された放線菌株が生産する HSM について、さらには、これまでに発見した HSM の生産菌を用いた HSM 生産現象の解析について進捗を報告したい。

＜英語＞

Our research group discovered that high-temperature culture of actinomycetes induces the production of dormant secondary metabolites. These compounds were named “heat shock metabolites (HSMs)”. So far, some HSMs, including bacterial hormone SCB1 and angucyclines were identified. Whereas, functional analysis by compound complementation or biosynthetic gene deletion indicated that these HSMs relate to thermotolerance. For instance, bacterial hormone SCB1 and angucyclines induced the other HSM production and thermotolerance. In this project, to reveal the molecular mechanism of HSM production phenomenon, we are working on isolation and structure determination of HSMs, and analysis of HSM production mechanism and physiological significance. In this presentation, we will report about HSMs produced by actinomycete strain derived from Japanese soil, and the progress of analysis about HSM production phenomenon using HSM producing actinomycete strains.

Actinomycete, high-temperature culture, Heat Shock Metabolites (HSMs)

発表責任者：荒井緑（midori_arai@bio.keio.ac.jp）

講演番号：2F07-04
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 13:30～ ミーティングルーム F

マコモに感染する黒穂菌に関する化学的研究
Chemical studies on *Ustilago esculenta* that infects *Zizania latifolia*

○呉 静[1]、森本 悠介[2]、崔 宰熏[1,2,3]、平井 浩文[1,2,3]、河岸 洋和[1,2,3] ([1]静大・グリーン研、[2]静大院・総合農、[3]静大院・創造)
○ Jing WU[1], Yusuuke MORIMOTO[2], Jae-Hoon CHOI[1,2,3], Hirofumi HIRAI[1,2,3], Hirokazu KAWAGISHI[1,2,3] ([1]RIGST, Shizuoka Univ., [2]Grad. Sch. of Integ. Sci. and Technol., [3]Grad. Sch. of Sci. and Technol., Shizuoka Univ.)

【目的】マコモタケとはイネ科マコモ属であるマコモ（*Zizania latifolia*）に黒穂菌（*Ustilago esculenta*）が感染することによって肥大化したものであり，日本，中国などのアジア各国において，美味な食材として知られるようになってきた。その肥大化の原因として黒穂菌の感染によってオーキシンが盛んに分泌され，茎での細胞分裂が活性化すると言われている。しかし，我々は黒穂菌がオーキシン以外の肥大化の誘導物質を産生していると仮定し，その化合物の単離・精製，構造決定及び共生のメカニズムの解明を試みている。当研究室では既にマコモタケから破骨前駆細胞分化抑制物質 makomotine 類および腫瘍細胞増殖抑制物質 makomotindoline 類を発見し，黒穂菌培養ろ液から 5 種の化合物を新規物質として単離したが，植物に対する活性は認められなかった。本研究では、黒穂菌からさらなる活性物質の探索を目的とした。
【方法・結果】黒穂菌を前培養したものを，ポテトデキストロースブロス培地を用いてジャーファメンターで培養した後，濾過を行い培養ろ液を得た。その後，減圧濃縮した粗抽出物を，*n*-ヘキサン，酢酸エチルおよび *n*-ブタノールで順次液-液分配, 乾固した後エタノールで固-液分配し, 減圧濃縮後，各可溶部を得た。得られた酢酸エチル可溶部をフラッシュカラムクロマトグラフィー，HPLC を用いて分画し，化合物の単離および精製を試みた。現在，単離した化合物は NMR, IR, MS を用いて構造決定を行っている。さらに，植物成長調節活性試験を行い，マコモの肥大化の誘導物質かどうかを検討する。

Zizania latifolia, which belongs to the genus *Zizania* in the Poaceae family, is enlarged by infection with one of smut fungi, *Ustilago esculenta*, and known as a delicious food, Makomotake (in Japanese), in Asia. It has been reported that auxin was secreted by the smut infection as the cause of the hypertrophy and cell division was activated in the stem. However, we hypothesized that the fungus produced other hypertrophy-inducing compounds. In this study, we attempted to isolate and determine structures of the hypertrophy-inducing compounds. The culture broth of *Ustilago esculenta* was filtrated and then concentrated under reduced pressure. The concentrated extracts were partitioned between *n*-hexane and water, EtOAc and water, and then *n*-BuOH and water, successively. The water soluble part was dried under reduced pressure, and then extracted with EtOH. The EtOAc soluble part and the water soluble part showed the plant growth regulatory activity. Furthermore, the EtOAc soluble part was subjected to repeated chromatography to afford several compounds.

Zizania latifolia, *Ustilago esculenta*, structure determination

発表責任者：河岸洋和（kawagishi.hirokazu@shizuoka.ac.jp）

講演番号：2F07-05
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 13:30～ ミーティングルーム F

放線菌 *Streptomyces* sp. 519S から得られた lanthidin クラスに属する新規ペプチドの単離と構造決定

Isolation and structure determination of new peptide belonging to lanthidin class from *Streptomyces* sp. 519S

○荒川 美彩[1]、道羅 英夫[2]、小谷 真也[1] ([1]静大院農、[2]静大グリーン研)
○Misa Arakawa[1], Hideo Dohra[2], Shinya Kodani[1] ([1]Shizuoka Univ. Grad. Sch. Agr., [2]Shizuoka Univ. Inst. Green)

リボソーム翻訳系翻訳後修飾ペプチド（Ripps）は、多様な分子を含む。最近の研究において、lanthidin と命名されたサブクラスが新たに Ripps に加わった（Ortiz-López et al. Angew Chem Int Ed Engl. 2020）。Lanthidin の翻訳後修飾により、Ser を脱水したのちに還元することで形成される D-Ala をはじめ、N 末残基のジメチル化や C 末のアミノビニルメチルシステイン環などが形成される。本研究において沖縄海洋土壌から採取した海洋放線菌 *Streptomyces* sp. 519S から、lanthidin グループに含まれる新規ペプチドを単離した。MS/MS の解析を行うことにより、部分アミノ酸配列を決定することができたが、溶解性の問題から NMR の解析が行えなかったので完全な構造決定には至らなかった。また、519S 株のゲノムシーケンスを行ったところ、典型的な lanthidin の生合成遺伝子クラスターを見出した。そこで、前駆体遺伝子のアミノ酸配列との比較で、構造の推定を行った。519S 株の遺伝子クラスターを用いて、NCBI データベースより検索したところ、約 50 株の放線菌において、類似した遺伝子クラスターが存在することが明らかになり、広く放線菌に分布することが示された。

Ribosomally biosynthesized post-translationally modified peptides (Ripps) contain a variety of molecules. In a recent study, a new sub-class named lanthidin has been reported to be a member of Ripps (Ortiz-López et al. Angew Chem Int Ed Engl. 2020). Post-translational modifications of lanthidin afford D-Ala, which is formed by dehydration and successive reduction of Ser, as well as dimethylation of N-terminal residues and aminovinyl-methylcysteine ring at C-terminal. In this study, a novel peptide of the lanthidin group was isolated from a marine actinomycete *Streptomyces* sp. 519S collected from Okinawa marine soil. Although the partial amino acid sequence was determined by MS/MS analysis, complete structure determination was not possible since NMR analysis could not be performed due to solubility problem. Then, the genome sequencing of the 519S strain was performed, a typical lanthidin biosynthetic gene cluster was found. The structure was predicted by comparing with the amino acid sequence of the precursor gene. A search from the NCBI database using the gene cluster of the 519S strain revealed that similar gene clusters exist in about 50 actinomycetes, indicating that they are widely distributed in actinomycetes.

peptide, *Streptomyces*, genome mining

講演番号：2F07-06
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 13:30～ ミーティングルーム F

「天狗の麦飯」から分離されたクテドノバクテリア（*Dictyobacter alpinus* Uno16）からの抗菌化合物の探索

Isolation of antibacterial compounds from *Dictyobacter alpinus* Uno16 derived from "Tengu-no-mugimeshi"

○齋藤 彩菜[1]、白石 太郎[2]、葛山 智久[2,3]、新谷 尚弘[1]、工藤 雄大[1,4]、山下 まり[1]、阿部 敬悦[1]、横田 明[1]、矢部 修平[1]（[1]東北大院農、[2]東大院・農生化、[3]東大・微生物連携機構、[4]東北大学際研）
○Ayana SAITO[1], Taro SHIRAISHII[2], Tomohisa KUZUYAMA[2,3], Takohiro SHINTANI[1], Yuta KUDO[1,4], Mari YAMASHITA[1], Keietsu ABE[1], Akira YOKOTA[1], Syuhei YABE[1] ([1]Graduate School of Agricultural Science, Tohoku Univ., [2]Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo, [3]Collaborative Research Institute for Innovative Microbiology, The University of Tokyo, [4]Frontier Research Institute for Interdisciplinary Sciences, Tohoku Univ.)

【背景と目的】近年、創薬資源「放線菌」に由来する新規抗菌薬の発見頻度が急減するなか、新奇系統「クテドノバクテリア綱」が発見された。この分類群は、共通して放射状の菌糸に胞子や胞子嚢を形成し、多様な二次代謝産物生合成遺伝子群を持つなど典型的な放線菌の特徴を有する。これらは主に堆肥や火山地帯、南極などの貧栄養環境に生息し、“食べられる土”として知られる微生物塊「天狗の麦飯」の主要構成菌群でもある。本研究では「天狗の麦飯」から単離し、新種記載したクテドノバクテリア *Dictyobacter alpinus* Uno16（Wang *et al., IJSEM,* 2019）から新規抗菌物質を探索した。
【方法と結果及び考察】Uno16 の培養液から、*Escherichia coli ΔtolC* や *Staphylococcus aureus* に抗菌活性を示す化合物を、LH20 と逆相クロマトグラフィーにより精製した。LC/MS/MS や NMR による構造解析の結果、これは 2-amino-3-carboxy-1,4-naphthoquinone と同定された。この化合物は *Propionibacterium freudenreichii* から既に単離され、ビフィズス菌への増殖促進活性を持つことが報告されているが（Kaneko *et al., J Daily Sci,* 1994）、本研究により抗菌活性を示すことを初めて明らかにすることができた。この被験菌種に対する生物活性の違いや作用機序についてさらなる解析が必要である。本報告では、該化合物の抗菌活性について考察する。

Decrease in the discovery of novel antibiotics promotes us to unearth natural products from microbial resources. *Ktedonobacteria* share similarities with actinomycetes. They are ubiquitous in terrestrial environments. Notably, the taxa dominated a soil-like granular mass of microbes termed ‘Tengu-no-mugimeshi’, known as ‘edible soil’. In this study, we explored new antimicrobial compounds from *Dictyobacter alpinus* Uno16 (*Ktedonobacteria* class) isolated from “Tengu-no-mugimeshi”.

We isolated an antimicrobial compound against *Escherichia coli ΔtolC* and *Staphylococcus aureus* from Uno16. This compound was 2-amino-3-carboxy-1,4-naphthoquinone, which has already been isolated from *Propionibacterium freudenreichii* as the growth stimulator against bifidobacteria (Kaneko *et al., J Daily Sci.*, 1994). This is the first report to show that the compound shows antimicrobial activity. Further research is needed to elucidate the mechanism of this bioactivity.

Ktedonobacteria, antibacterial compounds, 2-amino-3-carboxy-1,4-Naphthoquinone

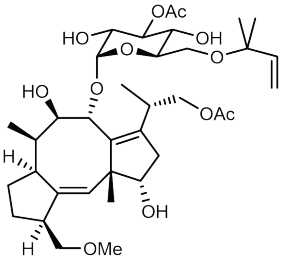
発表責任者：矢部修平（shuhei.yabe.b2@tohoku.ac.jp）

講演番号：2F07-07
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 13:30～ ミーティングルーム F

植物病原菌二次代謝産物フシコクシンの気孔開口による成長促進効果の検証

Fungal toxin fusicoccin promotes stomatal opening and enhances plant growth

○桐山 寛生[1]、木下 悟[2]、木下 俊則[2]、春日 重光[1]、入枝 泰樹[1]、大神田 淳子[1]([1]信州大農、[2]名大院理)
○Hironaru KIRIYAMA[1], Satoru KINOSHITA[2], Toshinori KINOSHITA[2], Shigemitsu KASUGA[1], Hiroki IRIEDA[1], Junko OHKANDA[1] ([1]Shinshu Univ., [2]Nagoya Univ.)



FC-A

気孔は植物の表皮に存在し、1 対の孔辺細胞とその周辺の細胞から成るガス交換を担っている。植物は気孔を通じ、光合成に必要な二酸化炭素の葉内濃度を最適化し、蒸散による水分損失を最小化している。2014 年木下らにより、孔辺細胞に細胞膜 H^+-ATPase を過剰発現した形質転換シロイヌナズナでは気孔開度が向上し、二酸化炭素吸収量と光合成速度が増加し植物の成長が促進されたことが報告された[1]。このことは、気孔開度の制御が植物の成長効率を大きく増加させることを示している。本研究では、細胞膜 H^+-ATPase の C 末端リン酸化領域と 14-3-3 とのタンパク質相互作用を安定化して気孔開口を促進し、最終的に植物を枯死させる植物毒として知られる植物病原菌二次代謝産物フシコクシン(FC)に着目し、遺伝子組換えに頼らない有機分子による気孔開口制御を目指した。共免疫沈降実験にて天然型 FC-A が H^+-ATPase と 14-3-3 の相互作用に及ぼす効果を検証した。また、野生型シロイヌナズナの気孔開口、二酸化炭素吸収量と光合成活性への影響を検討した。さらに、25 日間継続して FC-A をシロイヌナズナに滴下し、新鮮重・乾燥重の変化を検討した。本発表では、FC の栽培植物への効果についても報告する。

Stomata are the pores in the plant epidermis surrounded by a pair of guard cells and are responsible for gas exchange. Through the stomata, plants optimize the concentration of carbon dioxide for photosynthesis in the leaf and minimize water loss. In 2014, Kinoshita et al. reported that overexpression of a plasma membrane (PM) H^+-ATPase in *Arabidopsis* guard cells enhances the stomatal opening, carbon dioxide uptake, and the rate of photosynthesis, promoting plant growth. These results indicate that control of stomatal opening greatly increases plant growth efficiency. In this study, we envisioned that fusicoccin (FC), a fungal phytotoxin that stabilizes protein-protein interaction between the C-terminal phosphorylation region of PM H^+-ATPase and 14-3-3, may serve as a chemical promotor of plant growth by enhancing stomatal opening under optimal conditions. A series of experiments to evaluate the effect of FC-A on the protein-protein interaction (PPI) between PM H^+-ATPase and 14-3-3, stomatal conductance and photosynthesis activity, were carried out, respectively. Long-term treatment of *Arabidopsis* with FC-A was also performed. The experimental details and the effects on other plants will also be discussed.

[1] Y. Wang, K. Noguchi, N. Ono, S. Inoue, I. Terashima, T. Kinoshita, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2014**, *111*, 533.

Fusicoccin, Stomatal opening, Plant growth regulator

発表責任者：大神田淳子（johkanda@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：2F07-08
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 13:30～ ミーティングルーム F

肝細胞糖産生を抑制するヒドロキシ脂肪酸 ricinoleic acid 類の構造活性相関研究

Structure-activity relationship study of ricinoleic acid suppressing hepatocellular glucose production

○吉田 潤[1]、上杉 祥太[2]、箱崎 真友佳[2]、藤澤 日土美[3]、伊藤 芳明[3]、木村 賢一[3]([1]岩手医科大・教養教育、[2]岩手生工研、[3]岩手大・農)
○Jun YOSHIDA[1], Shota UESUGI[2], Mayuka HAKOZAKI[2], Hitomi FUJISAWA[3], Yoshiaki ITO[3], Ken-ichi KIMURA[3] ([1]Center Lib. Arts and Sci., Iwate Med. Univ., [2]IBRC, [3]Fac. of Agri., Iwate Univ.)

【目的】Ricinoleic acid (RA)はトウダイグサ科植物のトウゴマの種子油(ヒマシ油)から得られるヒドロキシ不飽和脂肪酸である。我々はこれまでに、RA のカルシニューリン阻害活性と脱顆粒抑制作用、並びに GSK-3β阻害活性と糖新生抑制作用を明らかにした[1)]。本研究では、各種 RA 構造類縁体の生物活性を比較してその構造活性相関を明らかにすることを目的とした。
【方法】プロテインキナーゼ阻害プロファイリングは、ヒト GSK-3β と合成ペプチド基質を用いた Mobility shift assay による STK パネル(カルナバイオサイエンス)にて測定した。培養細胞における糖新生抑制試験は、糖新生を活性化したラット肝がん細胞 H4IIE が培地中に放出するグルコースを Amplex Red グルコースオキシダーゼ/ペルオキシダーゼ法で定量した。
【結果・考察】RA と oleic acid(OA)の 35 種類のセリン/スレオニンプロテインキナーゼに対する阻害活性を測定した結果、50 μM で 50%以上阻害されたキナーゼが RA で 9 種類、OA で 2 種類認められた。このうち、生細胞内 ATP 濃度を指標とした条件下(ATP 1 mM)で約 50%以上阻害されたキナーゼが、RA で 4 種類: GSK-3β (47.2%、IC_{50}=9.1 μM); Erk5(51.7%、IC_{50}=26.1 μM); PIM1(72.6%); IKKβ(68.7%)、OA で 1 種類(PIM1、45.3%)認められた。糖新生抑制試験では、RA 構造類縁体のうちヒドロキシ基をもつ飽和脂肪酸の 12-HSA と 9,10-DHSA、並びに RA のトランス異性体の ricinelaidic acid が、12.5 μM から濃度依存的に H4IIE 細胞のグルコース産生を抑制した。以上の結果から、RA の活性にはヒドロキシ基が重要であり、ヒドロキシオクタデカン酸類は抗糖尿病効果を有する可能性が得られた。
1) Yoshida J. et al., *Lipids* 55, 89-99 (2020)

【Purpose】Ricinoleic acid (RA) is a hydroxy fatty acid derived from castor oil. We found inhibitory activity of calcineurin and GSK-3β by RA[1)]. The purpose of this study was to clarify the structure-activity relationship of RA and to identify new functional lipids.【Results and Discussion】The inhibitory activities of RA and oleic acid (OA) on 35 types of serine/threonine protein kinases were determined at 50 μM and 1 mM ATP, and RA was found to strongly inhibit 4 kinases: GSK-3β (47.2%, IC_{50}=9.1 μM); Erk5 (51.7%, IC_{50}=26.1 μM); PIM1 (72.6%); and IKKβ (68.7%), and OA strongly inhibited 1 kinase (PIM1, 45.3%). Hydroxy fatty acids of 12-HSA, 9,10-DHSA, and ricinelaidic acid suppressed glucose production in H4IIE cells at 12.5 μM in a dose-dependent manner. From the above results, it was determined that the hydroxy group is important for the activity of RA.

Ricinoleic acid, GSK-3ß, Gluconeogenesis

発表責任者：吉田 潤（jyoshida@iwate-med.ac.jp）

講演番号：2F07-09
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 13:30～ ミーティングルーム F

カンゾウ由来成分 Glabridin とショウガ由来成分 Dehydrozingerone による相乗的な抗真菌効果およびそのメカニズム

Synergistic antifungal mechanism of glabridin and dehydrozingerone.

○山野 沙耶[1]、荻田 亮[1,2]、山口 良弘[1]、藤田 憲一[1]([1]阪市大院・理、[2]阪市大・健康研セ)
○Saya YAMANO[1], Akira OGITA[1,2], Yoshihiro YAMAGUCHI[1], Ken-ichi FUJITA[1] ([1]Grad Sch Sci, Osaka City Univ, [2]Res. Center Urban Health and Sports, Osaka City Univ)

食品の保存性を短時間高める目的で使用される日持ち向上剤は、処理後に菌が増殖しはじめることがあり、抗真菌活性の持続性や増強が求められている。日持ち向上剤に含まれる抗菌成分グラブリジンは、真菌における薬効減弱化の原因の一つである薬剤排出ポンプの多重遺伝子欠損株に対して、0.05 mM の処理で出芽酵母の生育を少なくとも 48 時間抑制した。以上より、薬剤排出を抑制できれば、グラブリジンの抗菌活性を大幅に改善できると期待される。グラブリジンは、カンゾウ（*Glycyrrhiza glabra*）の根から抽出されたフラボノイドであり、ヒトに対して抗ガン作用、美白作用なども報告されている。

本研究では、薬剤排出を抑制するデヒドロジンゲロンと併用することで、グラブリジンの抗真菌活性を増幅できるのか、また、その作用には薬剤排出ポンプの抑制が関与するのかを出芽酵母を用いて検証した。デヒドロジンゲロンはショウガに微量含まれる辛味成分の一つである。本研究室の先行研究により、デヒドロジンゲロンは出芽酵母の薬剤耐性に関与する薬剤排出ポンプの遺伝子発現を抑制することが明らかとなっている。

両薬剤を併用した場合、FIC index=0.75 となり、弱い相乗的抗真菌活性が認められた。また、複数の薬剤排出ポンプを制御する転写因子 *PDR1*・*PDR3* および多剤耐性の薬剤排出ポンプ *PDR5* の転写が抑制された。ただし、*PDR5* など薬剤排出ポンプの各欠損株は親株と同様の低いグラブリジン感受性を示したので、グラブリジンは複数の薬剤排出ポンプより排出される可能性が指摘された。以上より、デヒドロジンゲロンは、同時に複数の薬剤排出ポンプの転写を抑制し、グラブリジンの抗真菌活性を増幅する可能性が示唆された。

Glabridin is extracted from the root licorice (*Glycyrrhiza glabra*) and restricting the growth of microorganisms including food spoilage fungi. The antifungal effects are weak and temporary. Thus, it is needed for potentiation of the effects to restrict fungi in foods. We found weak synergistic antifungal effect of glabridin and dehydrozingerone against budding yeast. This effect seemed to depend on transcription inhibition of several multidrug ABC transporters and their transcription factors *PDR1* and *PDR3* judging from the results of analyses using gene-deficient strains and real time PCR. From the results obtained above, this combination of drugs is a potential candidate to restrict food spoilage fungi.

Glabridin, multidrug ABC transporter, antifungal activity

発表責任者：藤田　憲一（kfujita@osaka-cu.ac.jp）

講演番号：2F07-10
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 13:30～ ミーティングルーム F

ICAM-1 の糖鎖修飾と細胞内輸送に対するウルサン型五環性トリテルペノイドの作用機序の解析

Mechanism of action of ursan-type pentacyclic triterpenoids on glycosylation and intracellular transport of ICAM-1

○中野 香織、佐々木 咲季、片岡 孝夫（京都工芸繊維大学・応生）
○Kaori NAKANO, Saki SASAKI, Takao KATAOKA (Dept. Appl. Biol., Kyoto Inst. Tech.)

【目的】五環性トリテルペノイド類は様々な植物に見出され、抗炎症活性や抗腫瘍活性などの多彩な生理活性を有する。これまでに、我々は五環性トリテルペノイドが炎症性サイトカイン interleukin-1α (IL-1α)によって発現誘導される細胞接着因子 intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1)の糖鎖修飾や細胞内輸送に作用することを明らかにしてきた。本研究では、ICAM-1 の糖鎖修飾や細胞内輸送に対するウルサン型五環性トリテルペノイドの作用機序を明らかにすることを目的とした。
【方法】ヒト肺がん腫 A549 細胞を五環性トリテルペノイドで 1 時間処理した後、IL-1α で 6 時間処理し、ICAM-1 発現を誘導した。細胞表面の ICAM-1 発現量を ELISA 法、細胞内の ICAM-1 の発現量と分子量の変化をウェスタンブロッティングによって調べた。
【結果】OH 基を 3 個有する asiatic acid は ICAM-1 の糖鎖修飾と細胞内輸送に作用したが [1)]、OH 基を 4 個有する madecassic acid は ICAM-1 の糖鎖修飾と細胞内輸送に影響しなかった。Ursolic acid は ICAM-1 の細胞内輸送を阻害し、その糖鎖修飾に作用したが [2)]、その COOH 基が CH_2OH 基に置換された uvaol は ICAM-1 の糖鎖修飾に影響しなかった。一方、ursolic acid と COOH 基の位置が異なる β-boswellic acid は ICAM-1 の糖鎖修飾に影響した。以上の結果から、ウルサン型五環性トリテルペノイドにおいて、COOH 基が ICAM-1 の糖鎖修飾に対する生物活性に必須であること、及び OH 基の数が ICAM-1 の糖鎖修飾と細胞内輸送に対する生物活性に影響することが明らかになった。

Pentacyclic triterpenoids are contained in various plants, and exert biological activities, such as anti-inflammatory activity and anti-tumor activity. We previously found that pentacyclic triterpenoids interfered with glycosylation and intracellular transport of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) induced by the inflammatory cytokine interleukin-1α. The purpose of this study was to clarify the mechanism of action of ursan-type pentacyclic triterpenoids on the glycosylation and intracellular transport of ICAM-1. Asiatic acid with three hydroxy moieties affected ICAM glycosylation and transport[1)], while madecassic acid with four hydroxy moieties did not affect these processes. Ursolic acid inhibited ICAM-1 transport and interfered with its glycosylation[2)], whereas uvaol with a CH_2OH moiety instead of a COOH moiety, did not affect ICAM-1 glycosylation. β-Boswellic acid with a COOH moiety at the position different from ursolic acid, affected ICAM-1 glycosylation.

[1] Baba, K. et al., Biol. Pharm. Bull., 41, 1757-1768 (2018)
[2] Mitsuda, S. et al., FEBS Open Bio, 4, 229-239 (2014)

β-boswellic acid, ICAM-1, triterpenoid

講演番号：2F07-11
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 13:30～ ミーティングルーム F

Isopanduratin A は TNF レセプター１のエクトドメインシェディングを誘導することによって TNF-α誘導性の NF-κB シグナル伝達経路を阻害する

Isopanduratin A inhibits TNF-α-induced NF-κB signaling pathway by inducing ectodomain shedding of TNF receptor 1

○森脇 千紘[1]、谷垣 里穂[1]、三宅 靖延[2]、VO Trong Nghia[1]、NGUYEN Thi Thanh Mai[3]、NGUYEN Trung Nhan[3]、DO Van Nhat Truong[3]、NGUYEN Xuan Hai[3]、片岡 孝夫[1]（[1]京都工芸繊維大学・応生、[2]佐賀大学・医、[3]ベトナム国家大学ホーチミン市校）
○Chihiro MORIWAKI[1], Riho TANIGAKI[1], Yasunobu MIYAKE[2], Nghia Trong VO[1], Mai Thi Thanh NGUYEN[3], Nhan Trung NGUYEN[3], Truong Van Nhat DO[3], Hai Xuan NGUYEN[3], Takao KATAOKA[1] ([1]Dept. Appl. Biol., Kyoto Inst. Tech., [2]Faculty of Med., Saga Univ., [3]Faculty of Chemistry, University of Science, Vietnam National University, Ho Chi Minh City)

【目的】Isopanduratin A（IPA）は、*Boesenbergia pandurata* から単離された小分子化合物であり、ヒト膵臓がん PANC-1 細胞に対する抗がん活性を有する[1)]。これまでに、我々は、IPA がヒト肺がん腫 A549 細胞において TNF-α で誘導される NF-κB シグナル伝達経路を阻害することを報告した[2)]。本研究では、IPA の詳細な作用機序を解明することを目的とした。
【方法】ヒト肺がん腫 A549 細胞を IPA および TAPI-2 で処理した。フローサイトメトリーによって細胞表面の TNF レセプター１発現を調べた。ウェスタンブロット法を用いて培養上清および細胞ライゼートの TNF レセプター１を検出した。無細胞翻訳系に対する IPA の作用を調べた。
【結果】IPA は、細胞表面の TNF レセプター１発現を減少させ、この減少は TACE 阻害剤である TAPI-2 処理により阻害された。さらに IPA 処理により培養上清中に低分子量化した可溶性 TNF レセプター１が検出された。IPA はタンパク質翻訳阻害活性を持たなかった。以上の結果から、IPA はリボトキシックストレス応答に依存せずに、TNF レセプター１のエクトドメインシェディングを誘導し、TNF-α誘導性の NF-κB シグナル伝達経路を阻害するという新しいメカニズムが明らかになった。
【Introduction】Isopanduratin A (IPA) was isolated from the methanol extract of the rhizomes of *Boesenbergia pandurata* and exerted anti-tumor activity against human pancreatic cancer PANC-1 cells[1)]. IPA also inhibited the TNF-α-induced NF-κB signaling pathway in human lung adenocarcinoma A549 cells[2)]. In this study, we elucidated the molecular mechanism by which IPA inhibited the NF-κB signaling pathway.
【Methods】A549 cells were treated with IPA and/or TAPI-2. Cell-surface TNF receptor 1 expression was examined by flow cytometry. The amount of TNF receptor 1 in the culture supernatants and cell lysates was analyzed by Western blotting. The effect of IPA on cell-free translation was evaluated.
【Results】The cell-surface expression of TNF receptor 1 was inhibited by IPA, which was antagonized by TAPI-2. Soluble TNF receptor 1 with smaller molecular weight was detected in the culture supernatant of IPA-treated cells. IPA did not affect cell-free translation. These results indicate that IPA induces ectodomain shedding of TNF receptor 1 by a mechanism independent of ribotoxic stress response and thereby inhibits the TNF-α-induced NF-κB signaling pathway.
[1] Nguyen, N. T. et al., J. Nat. Prod., 80, 141-148 (2017)
[2] Tanigaki, R. et al., Biol. Pharm. Bull., 42, 26-33 (2019)

isopanduratin A, TNF receptor 1, ectodomain shedding

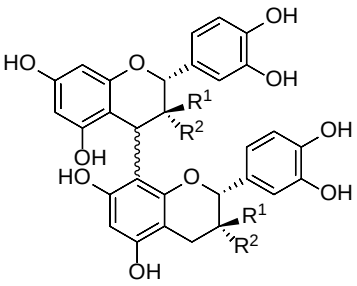
講演番号：2F07-12
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 13:30～ ミーティングルーム F

プロシアニジン B2 の酸化機構の解明

Elucidation of the oxidation mechanism of procyanidin B2

○諏訪 雄大[1]、林 咲那[1]、片岡 永[2]、柳瀬 笑子[1,2]([1]岐阜大院自然科技、[2]岐阜大応生)
○Yudai SUWA[1], Sakina HAYASHI[1], Haruka KATAOKA[2], Emiko YANASE[1,2] ([1]Natural Science and Technology, Gifu Univ., [2]Faculty of Applied Biological Sciences, Gifu Univ.)

プロシアニジン類は、カテキンやエピカテキンが重合した構造を有している。本化合物は多くの植物性食品に含まれており、加工工程で変化することが報告されているが、その反応メカニズムや構造は明らかになっていない。当研究室では、プロシアニジン類のモデル化合物として (+) カテキン 2 量体 (**1**) の酸化反応により、スピロ環を有する化合物の同定を報告している。本研究では、(-) エピカテキン 2 量体 (**2**) の酸化反応を行い、構造の変化、メカニズム及び立体の違いによる反応性の違いを明らかにすることを目的とした。



1 : R^1 = OH, R^2 = H, ～ = ⋯⋯
2 : R^1 = H, R^2 = OH, ～ = ▬

(-) エピカテキンを出発原料として、4 steps、総収率 28.3% で **2** を合成した。**2** を H_2O または 50% dioxane 水溶液に溶解し、塩化銅(Ⅱ)を用いて酸化して、酸化物Ⅰと酸化物Ⅱを得た。これら 2 つの化合物については各種 NMR 測定及び MS 測定による構造決定を行い、酸化物Ⅰの構造を推定した。さらに、酸化物Ⅱについては $NaBH_4$ による還元反応を行い、化合物Ⅲ及びⅣを得た。化合物Ⅳの各種 NMR データに基づいて、酸化物Ⅱの構造を推定した。

Procyanidins, a class of polyphenols, are condensed tannins comprising flavan-3-ols such as catechin and epicatechin. They are widely distributed in plants and have been reported to be oxidized during processing, but the formation mechanism and structure of these compounds are not yet known. We have reported the identification of a compound that oxidizes (+) catechin dimers (**1**) and has a spiro ring. The aims of this study were to synthesize (-) epicatechin dimers (**2**) and to elucidate the structural change and mechanism of the oxidation reaction and the differences in reactivity depending on the different conformations.

Using (-) epicatechin as a starting material, **2** was synthesized in 4 steps in total yield of 28.3%. **2** was dissolved in H_2O or 50% dioxane solution and oxidized with copper (II) chloride to yield oxide I and oxide II. The structures of these two compounds were determined by various NMR and MS measurements, and the structure of oxide I was estimated. In addition, oxide II was reduced by $NaBH_4$ to give two compounds. Based on the various NMR data of two compounds, we have estimated the structure of oxide II.

procyanidin, oxidation, reactivity

講演番号：2F07-13
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 13:30～ ミーティングルーム F

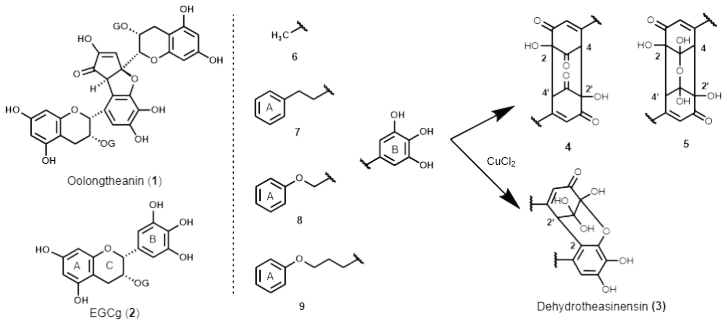
Understanding the Regioselectivity in the Oxidative Condensation of Catechins Using Pyrogallol-type Model Compounds

ピロガロール型モデル化合物を用いたカテキンの酸化的縮合における位置選択性の理解

○落合 悠斗[1]、廣瀬 紗弓[1]、柳瀬 笑子[1,2] ([1]岐阜大院自然科技、[2]岐阜大応生)
○Yuto OCHIAI[1], Sayumi HIROSE[1], Emiko YANASE[1,2] ([1]Natural Science and technology, Gifu Univ., [2]Faculty of Applied Biological Sciences, Gifu Univ.)

ウーロン茶に含まれるカテキン 2 量体であるウーロンテアニン類の生成メカニズム解明を目的に、カテキンのモデル化合物 **6-9** の酸化反応を行った。その結果、B 環部に 2C-2C 結合(**3**)または 2C-4C 結合（**4, 5**）をもつ化合物がそれぞれ異なる生成比で得られた。本研究ではこれらの結果を元に密度汎関数理論（DFT）法を用いて酸化重合の位置選択性のメカニズムを明らかにすることを目的とした。

モデル化合物 **6-9** について Gaussian16W を用いて B3LYP/6-31G **レベルで構造最適化したところ、**6**, **7**, **9** と比べて、**8** の B 環部のイオン化エネルギーが上昇した。また、**3** の熱力学的安定性は、**6, 9** 由来よりも **7, 8** 由来の方が高いことが明らかとなった。このことからカテキン B 環部の酸化反応による選択性には、A 環部同士の相互作用と C 環 1 位の酸素原子によるイオン化エネルギーの増大及び生成物 **3** の熱力学的安定化が関与していると示唆された。



We have been studying the synthesis and formation mechanism of **1** which is a dimer of EGCg (**2**) for the purpose of elucidating the structure of polymeric polyphenol contained in oolong tea. When the oxidation reaction of the model compounds **6-9** of **2** was carried out, compounds having a 2C-2C bond (**3**) or a 2C-4C bond (**4**,**5**) in the B ring were obtained with different production ratios. Based on these results, the purpose of this study was to clarify the mechanism of regioselectivity of oxidative coupling reaction using the density functional theory (DFT) method. When the model compounds **6-9** were structurally optimized at the B3LYP / 6-31G ** level using Gaussian 16W, the ionization energy of the B ring of **8** was increased as compared with **6**, **7**, **9**. It was also clarified that the thermodynamic stability of **3** derived from **7** and **8** was higher than from the **6** and **9**. Hence, it was suggested that the selectivity of the catechin B ring in the oxidation reaction involves the A rings interaction, the increase in ionization energy due to the oxygen atom at the 1st position of the C ring, and the thermodynamic stabilization of product **3**.

oxidation, DFT, Regioselectivity

講演番号：2F07-14
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 13:30～ ミーティングルーム F

ジュラ紀の紅藻の化石から得られた赤色色素 borolithochrome 類の合成研究

The synthetic studies on borolithochromes, a red pigment isolated from the fossil of Jurassic red alga

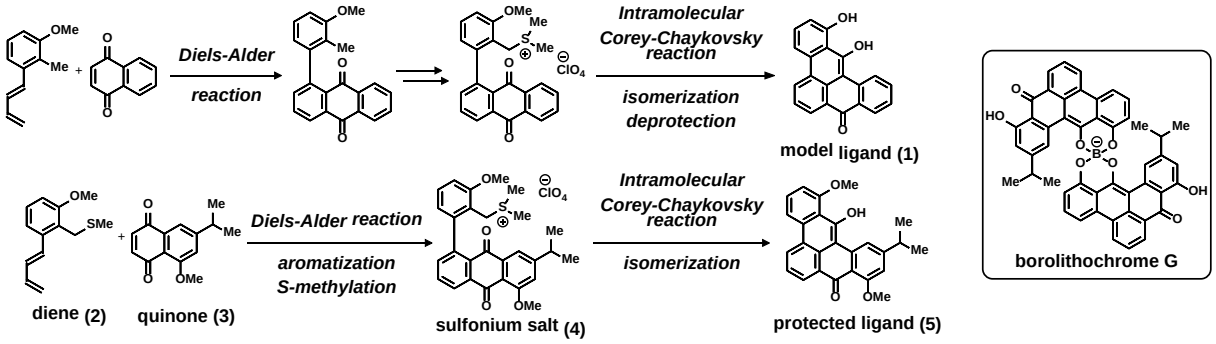
○桐田 奏、細川 誠二郎（早稲田大）
○Kanade KIRITA, Seijiro HOSOKAWA (Waseda Univ.)

Borolithochrome 類はジュラ紀の紅藻 *Solenopora Jurassica* の化石中から単離された化合物であり、希少な benzo[*gh*]tetraphene 骨格の芳香族ポリケチドをリガンドとするボレート化合物である。抽出量が微量なため、borolithochrome 類の生物活性は不明であるが、リガンドの類縁体に抗菌活性を有する化合物が知られていることから、borolithochrome 類も抗菌活性等の生物活性を持つことが期待される。

我々は現在までに Diels-Alder 反応および分子内 Corey-Chaykovsky 反応を用いた環構築を鍵反応として、borolithochrome 類のリガンドの基本骨格を持つ五環式化合物 **1** を合成した。また、ジエン **2** とキノン **3** との Diels-Alder 反応を行った後、芳香族化と S-メチル化によってスルホニウム塩 **4** へと変換し、分子内 Corey-Chaykovsky 反応と異性化を行うことで borolithochrome G の持つリガンドのメチル保護体 **5** を合成した。

Borolithochromes were isolated from the fossil of Jurassic red alga *Solenopora Jurassica*. These compounds were borate complexes possessing the rare benzo[*gh*]tetraphene ligands. The biological activities of borolithochromes have been unknown because of very small amount of the compounds from fossil. Since an analog of the ligand has the antibacterial activity, it is expected that borolithochromes also have biological activity such as antibacterial activity.

To date, we have synthesized model pentacyclic compound **1** by using Diels-Alder reaction and intramolecular Corey-Chaykovsky reaction as a key reaction to construct ring system. In addition, the synthetic studies on borolithochrome G is in progress. Diene **2** underwent the Diels-Alder reaction with quinone **3** followed by aromatization and S-methylation to afford the sulfonium salt **4**. Subsequent intramolecular Corey-Chaykovsky reaction and isomerization gave pentacyclic **5**, the protected ligand of borolithochrome G.



organic synthesis, natural product, aromatic compound

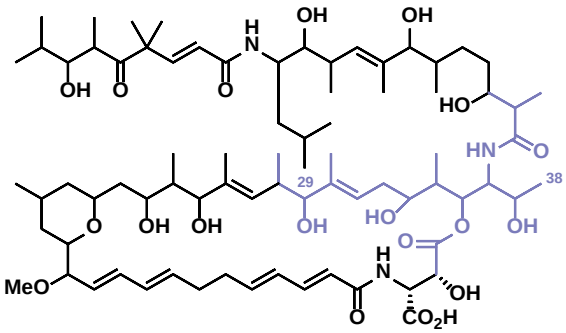
講演番号：2F07-15
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 13:30～ ミーティングルーム F

抗がん物質 poecillastrin C の C29-C38 部の合成研究

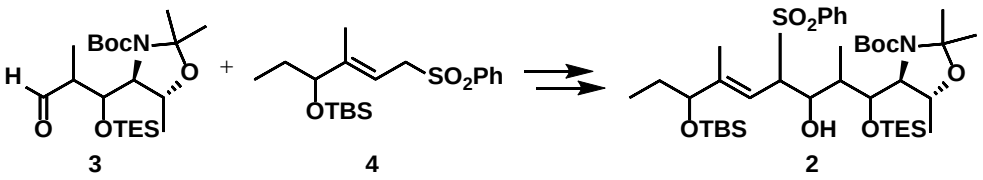
Synthetic studies on the C29-C38 segment of anticancer poecillastrin C

○田島 春佳、細川 誠二郎（早大院先進理工）
○Haruka TAJIMA, Seijiro HOSOKAWA (Waseda Univ.)

Poecillastrin C (**1**) は深海に生息する海綿より単離された 36 員環の大環状ラクタムであり、非常に強い抗がん活性を有していることが報告されている。現在までに平面構造のみが決定されており、天然から得られる試料が極微量であるため、絶対立体配置は決定されていない。そこで有機化学的手法を用いた poecillastrin C (**1**) の絶対立体配置の決定、合成法の確立、および量的供給による更なる作用機序の解明を目的として研究に着手した。



現在は、窒素を含み連続した 5 つの不斉炭素原子をもつ C29-C38 部の絶対立体配置を決定するため、候補化合物の合成をおこなっている。L-トレオニンより合成したアルデヒド **3** と 2-ブロモ-1,1-ジメトキシエタンより合成したスルホン **4** とのカップリングによって C29-C38 部 **2** を合成した。



Poecillastrin C (**1**) , a 36-membered macrocyclic lactam isolated from deep-sea sponges, has been reported to have potent anticancer activity. Although its planar structure has been determined, its absolute configuration has not been determined since only small amount of the natural products has been obtained. Therefore, in order to determine the absolute configuration of poecillastrin C (**1**) and to investigate the mode of action, we started the syhthetic studies.

To determine the absolute configuration of C29-C38 segment with nitrogen and five consecutive asymmetric carbon atoms, candidate compounds are synthesized. The coupling reaction between aldehyde **3** , synthesized from L-threonine, and sulfone **4** , obtained from 2-bromo-1,1-dimethoxyethane, was carried out to afford the C29-C38 segment **2** .

organic synthesis, structural determination, natural product

講演番号：2F07-16
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 13:30～ ミーティングルーム F

ボネラタミド類の合成研究

Synthetic studies on boneratamides

○大岡 海斗[1]、中西 啓介[1]、宇田川 裕多郎[1]、市川 善康[2]、細川 誠二郎[1] ([1]早大理工、[2]高知大理工)
○Kaito OOKA[1], Keisuke NAKANISHI[1], Yutaro UDAGAWA[1], Yoshiyasu ICHIKAWA[2], Seijiro HOSOKAWA[1] ([1]Waseda Univ., [2]Kochi Univ.)

【目的】ボネラタミド類は海綿から単離され、有糸分裂阻害活性を有する、スピロ[4.5]デセン骨格と特徴的なアミド側鎖を持つセスキテルペンである。ボネラタミド類は、ボネラタミド A-C が知られており、それらはグルタミン酸を含むアミド側鎖を持つ特異な構造を有する。我々は、このアミド側鎖が生体内 Ugi 反応により構築されたという仮説をもとにした合成戦略によって、 ボネラタミド類を合成できると考えた。

【方法・結果】ボネラタミド類の合成においては、 (+)-メントールを出発物質とし、分子内シクロプロパン化とアジド化によって、中核をなすスピロ[4.5]デセン骨格を構築した。数工程の変換を経て、イソシアニド基を有する共通中間体 (−)-10-エピ-アキソニトリル-3 を合成した。この中間体に対し、アセトンとグルタミン酸を用いる Ugi 反応を行うことで、特徴的なアミド側鎖を一挙に導入し、ボネラタミド A の合成を達成した。合成品と天然物の NMR データは良い一致を示した。

【Purpose】Boneratamide A-C, sesquiterpenes with a spiro[4.5]decene skeleton, have been isolated as their methyl esters from extracts of the marine sponges *Axinyssa aplysinoideas* collected in Indonesia in 2004. The boneratamides possess the unusual side chains containing glutamic acid. Based on the hypothesis that the amide side chain is constructed by the Ugi reaction *in vivo*, we planned the total synthesis of boneratamides.

【Methods and Results】Our synthesis of boneratamide A started from (+)-menthol. The core spiro[4,5]decene framework was constructed by intramolecular cyclopropanation and ring-opening azide introduction. Further manipulation of the spiro ring led to the successful synthesis of (−)-10-*epi*-axisonitrile-3, the common intermediate possessing the isocyanide group. The construction of the characteristic amide side chain by the Ugi reaction with acetone and glutamic acid led to achieve the synthesis of boneratamide A. The NMR data of the synthetic boneratamide A were identical with those of the natural product.

boneratamides, Ugi reaction, total synthesis

講演番号：2F07-17
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 13:30～ ミーティングルーム F

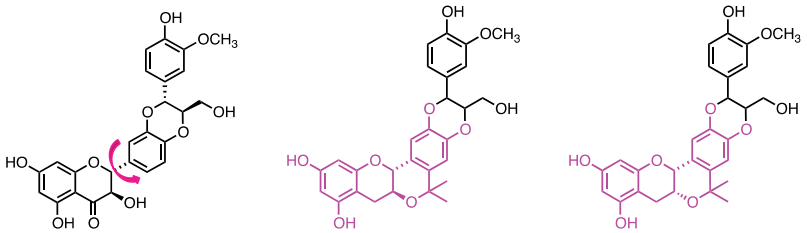
シリビニンの高機能化を目指した創薬研究

Design, synthesis, and biological activity of conformationally restricted analogues of silibinin

○水野 美麗[1]、森 一憲[1]、土屋 圭輔[1,3]、髙木 孝士[2]、三澤 隆史[3]、出水 庸介[3]、柴沼 質子[1]、福原 潔[1] ([1]昭和大薬、[2]昭和大医、[3]国衛研)
○ Mirei MIZUNO[1], Kazunori MORI[1], Keisuke TSUCHIYA[1,3], Takashi TAKAKI[2], Takashi MISAWA[3], Yosuke DEMIZU[3], Motoko SHIBANUMA[1], Kiyoshi FUKUHARA[1] ([1]Sch. of pharm.,Showa Univ., [2]Sch. of med.,Showa Univ., [3]NIHS)

フラバン骨格を有するポリフェノール類は、多様な生理活性を有することが報告されている。しかしこれらの活性は決して強力ではなく、医薬品の実用化には難しいことが課題である。我々はこれら活性の弱さに、分子内の自由回転が寄与していると考えた。自由回転を制御して受容体や酵素の活性中心への親和性が増強することを期待し、環固定化反応による立体構造の制御を試みた。当研究室では、catechin 類の立体構造を固定化した新規誘導体を合成した。(+)-catechin(Cat)を環固定化した PCat、(−)-epicatechin(EC)の環固定化体(PEC)のどちらも、天然型に比べて生物活性が増強した。

本研究では、マリアアザミの種子から抽出される silibinin(Sib)に注目した。これもフラバン骨格を有し、血糖降下作用や抗がん作用、アミロイドβへの作用など様々な活性を示す。この分子内の自由回転を制御する目的で、Sib のフラバン構造を PCat および PEC に置換した化合物(SibC, SibEC)を設計・合成した。次に、得られたこれらの化合物が有する活性と立体構造による影響を検討した。その結果、Sib に PCat を導入し立体構造を平面に固定化した SibC において、がん細胞増殖抑制作用、α-グルコシダーゼ阻害作用、アミロイドβ凝集阻害作用の増強を確認することができた。



Polyphenols have wide variety of bioactivities, but it is difficult to apply medicines because of their low activities. Since free rotation in molecules seems to depress their activities, we consider that restricted free rotation in molecules enhances their activities. In previous study, catechin analogues, in which geometry of (+)-catechin/ (-)-epicatehin were constrained, were synthesized. (PCat, PEC) PCat reduces 3D form to 2D form, but in the case of PEC, it failed to reduce 3D form to 2D form. Comparing with catechins, it exhibited potent radical scavenging activity and several novel biological activities. In this study, we designed the novel analogues (SibC, SibEC) in which the steric structure of Sib was constrained by introducing planar (PCat) or nonplanar catechin (PEC), respectively, in order to clarify the effect of molecular planarity on biological activities. The details of these bioactivities will be reported.

silibinin, catechin, Alzheimer's disease

発表責任者：水野　美麗（mizuno@pharm.showa-u.ac.jp）

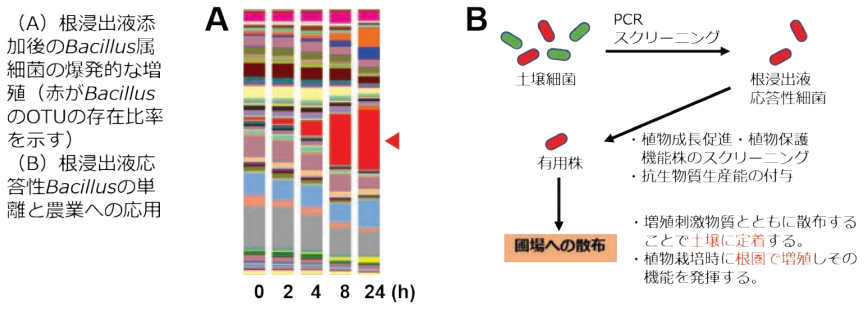
講演番号：2G01-01
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 09:00～ ミーティングルーム G

根から分泌される細菌増殖刺激物質
Root exudate derived microbe stimulating factor

○池ヶ谷 紘人、井田 和輝、小鹿 一、近藤 竜彦（名大農）
○Hiroto IKEGAYA, Kazuki IDA, Makoto OJIKA, Tatsuhiko KONDO (Nagoya Univ.)

【背景・目的】

我々は、植物の根浸出液を土壌に添加し、経時的に土壌菌叢のメタゲノム解析を行った結果、特定の *Bacillus* 属細菌の割合が短時間で爆発的に増加するという興味深い現象を発見した。この結果は、根浸出液中に含まれる生理活性物質によって、特定の *Bacillus* 属細菌の増殖が刺激されていることを示している。



（A）根浸出液添加後の*Bacillus*属細菌の爆発的な増殖（赤が*Bacillus*のOTUの存在比率を示す）
（B）根浸出液応答性*Bacillus*の単離と農業への応用

本研究では、根浸出液に応答する *Bacillus* 属細菌の簡便な単離方法を確立するとともに、この *Bacillus* 属細菌の増殖を刺激する生理活性物質の同定を目的とした。

【方法・結果】

根浸出液応答性の *Bacillus* 属細菌を単離するため、PCR を用いたスクリーニング法について検討を行った。16SrDNA の配列では近縁な *Bacillus* 属細菌を区別できないため、スクリーニングに用いる遺伝子、プライマーについて種々検討した結果、効率的なスクリーニング手法を確立し、複数の根浸出液応答株を単離した。また、土壌菌叢中の *Bacillus* の増殖を指標とした生物検定を確立し、前述の生理活性物質の精製を進めており、その結果についても本大会において報告したいと考えている。

We have found an interesting phenomenon of soil flora formation. The abundance ratio of several groups of bacteria classified into *Bacillus* increased drastically in 8 to 24 hours after application of the exudate prepared from plant seedlings. We established a simple scheme to isolate *Bacillus* strains which can respond to the exudate by using specific PCR screening. We also attempted to identify the bioactive compounds in the seedling exudate that stimulate Bacillus growth in soil flora, and we will report the purification and characterization of the bioactive compound(s).

plant growth promoting rhizobacteria, *bacillus*, biostimulant

講演番号：2G01-02
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 09:00～ ミーティングルーム G

ヒロヘリアオイラガ幼虫分泌液に含まれる TRPV1 活性化ペプチド Pll-3

TRPV1 activated peptide Pll-3 from slug caterpillar (Palasa lepida lepida) venoms

○大西 真吾、松井 翼、岡咲 洋三、勝崎 裕隆（三重大院生資）
○SHINGO ONISHI, TSUBASA MATSUI, YOZO OKAZAKI, HIROTAKA KATSUZAKI (Mie Univ.)

【背景・目的】

ヒロヘリアオイラガ(*Parasa lepida lapida*)はチョウ目イラガ科の昆虫であり、幼虫には多数の棘が存在する。棘が皮膚に触れると非常に激しい痛みが引き起こされる。この原因は棘の先端部から分泌される液体によるものだと考えられている。痛み研究においては、痛みと密な関連があると示唆されている transient receptor potential vanilloid 1(TRPV1)が着目されている。TRPV1 は活性化すると Ca^{2+}を細胞内に流入させる。当研究室の以前の研究で TRPV1 発現 HEK293 細胞を用いた細胞内カルシウムイメージングにより、ヒロヘリアオイラガ幼虫分泌液中に含まれる TRPV1 活性化物質が確認された。また、活性に重要とされる 3 つのジスルフィド結合をもったシスチンノットモチーフ構造のペプチドが発見されている。本研究では、ヒロヘリアオイラガ幼虫分泌液から RP-HPLC によって単離された TRPV1 活性化ペプチド Pll-3 のアミノ酸配列の決定、およびジスルフィド結合の結合位置の決定を目的とした。

【方法・結果】

Pll-3 を DTT とヨード酢酸により還元およびカルボキシメチル化(CM)化した。CM 化 Pll-3、およびトリプシンで酵素消化した CM 化 Pll-3 の断片を RP-HPLC により分取した。分取した画分を MALDI TOF-MS で MS/MS 測定し、生成したイオンピークの差からアミノ酸を順番に読み解くことで Pll-3 のアミノ酸配列を決定した。

Pll-3 を TCEP により完全還元および部分還元、そしてヨードアセトアミドを用いてカルバミドメチル化し、RP-HPLC により分取した。分取した画分を MALDI TOF-MS で MS/MS 測定し、生成したイオンピークの差から Cys 残基がカルバミドメチル化されているかを確認することで Pll-3 のジスルフィド結合の位置を決定した。

Parasa lepida lepida is an insect of the Lepidoptera Limacodidae family. The TRPV1 activator contained in the larval secretion of Parasa lepida was confirmed. In this study, the amino acid sequence and the position of the disulfide bond of the TRPV1 activating peptide Pll-3 derived from Parasa lepida lepida were determined by MALDI TOF-MS MS/MS measurement.

TRPV1, venom, slug caterpillar

発表責任者：勝崎裕隆（katsuzak@bio.mie-u.ac.jp）

講演番号：2G01-03
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 09:00～ ミーティングルーム G

ヤエヤマサソリの毒液に含まれる抗菌性ペプチドの探索と同定（第２報）

Exploration and identification of the antimicrobial peptides from the venom of the scorpion *Liocheles australasiae* (part 2)

○三谷 直也、宮下 正弘、中川 好秋、宮川 恒（京都大農）
○Naoya MITANI, Masahiro MIYASHITA, Yoshiaki NAKAGAWA, Hisashi MIYAGAWA (Kyoto Univ.)

【目的】サソリ毒液にはイオンチャネルに作用する神経毒ペプチドが多く含まれているが、これらに加えて抗菌性ペプチドが含まれている。当研究グループではこれまでにヤエヤマサソリ（*Liocheles australasiae*）の毒液から抗菌性ペプチド LaCT1、LaCT2、LaCT3 を同定してきたが、毒腺のトランスクリプトーム解析の結果から、これら以外にも抗菌性ペプチドが存在することが予想された。そこで本研究では、ヤエヤマサソリ毒液から主に質量分析計を用いて新奇抗菌性ペプチドを探索・同定し、その活性評価をおこなった。
【方法・結果】毒腺トランスクリプトーム解析の結果から、抗菌性ペプチドの候補配列が上記の 3 種以外に 6 種類存在することを推定した。これらのアミノ酸配列におけるシグナル配列やプロペプチド領域を他の類似ペプチドとの比較から推定し、この成熟型配列の質量を持つ毒液成分を質量分析データから探索した。その結果、毒液中に 6 種類の候補ペプチドと同質量の成分が存在することを確認した。このうち、LaCT2 と類似した構造を持つ 4 種のペプチドについて、その合成を Fmoc 固相合成法によりおこなった。得られた合成サンプルの逆相 HPLC 分析における保持時間を毒液由来成分と比較することで、その推定構造が正しいことを確認した。また、合成したペプチドを用いて 3 種類の細菌（*E. coli*、*S. aureus*、*B. subtilis*）に対して抗菌試験を行ったところ、顕著な活性が認められた。

Scorpion venom contains not only neurotoxic peptides, but also antimicrobial peptides. We have previously identified three antimicrobial peptides LaCT1, LaCT2, and LaCT3 in the venom of the scorpion *Liocheles australasiae*. In addition to these peptides, the presence of other antimicrobial peptides was suggested based on the result of transcriptome analysis of the venom gland. In this study, we searched for novel antimicrobial peptides from the *L. australasiae* venom.
We found six antimicrobial peptide candidates from the transcriptome data. Their mature sequences were estimated by comparing with those of other known peptides. Mass spectrometric analysis suggested that these peptides exist in the venom in their mature forms. Among them, four candidate peptides similar to LaCT2 were synthesized by the Fmoc solid-phase method, and their retention times in RP-HPLC analysis were compared with those of natural ones to confirm their identity. These peptides showed significant antimicrobial activity against three bacteria (*E. coli*, *S. aureus*, and *B. subtilis*), indicating that all function as an antimicrobial peptide.

antimicrobial peptide, transcriptome analysis, mass spectrometric analysis

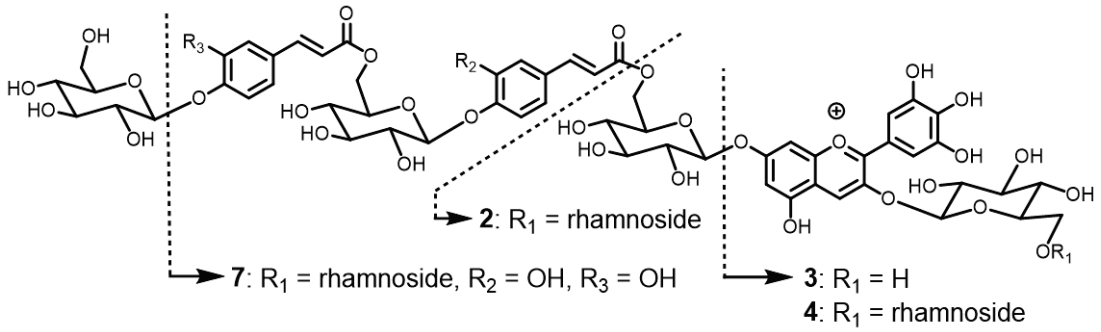
講演番号：2G01-04
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 09:00～ ミーティングルーム G

キキョウ花弁に含まれる青紫色素の単離と構造決定

Isolation and structure determination of the pigments in bluish-purple petal of Chinese bellflower (*Platycodon grandiflorus*)

○萩原 星児、近藤 忠雄、吉田 久美（名大情報）
○Seiji HAGIHARA, Tadao KONDO, Kumi YOSHIDA (Nagoya Univ.)

キキョウ(*Platycodon grandiflorus*)の青紫色花弁には多アシル化アントシアニンであるプラチコニン(**1**)が含まれることが報告されている [1)]。花弁抽出液を HPLC で分析した結果、**1** 以外にアントシアニンが 7 種含まれることが分かった。これらを単離し構造決定を行った。過去に Amberlite XAD-7 ゲルカラムクロマトグラフィーにより精製した粗色素を用い分取 HPLC により化合物 **3**, **4**, **5**, **7** を単離した。化合物 **6a**, **6b** はリサイクルシステムを用いて単離した。得られた色素は ESI-MS と NMR を用いて構造決定し、化合物 **5**, **6a**, **6b , 7** は新規色素であることがわかった。化合物 **2** の構造は、**1** のアルカリ加水分解生成物と一致した。これにより、花弁に含まれる全ての色素を明らかにした。キキョウアントシアニンの生合成経路に関する知見を得ることができたものと考える。



1: R_1 = rhamnoside, R_2 = R_3 = OH
5: R_1 = H, R_2 = R_3 = OH
6a: R_1= rhamnoside, R_2 = OH, R_3 = H
6b: R_1= rhamnoside, R_2 = H, R_3 = OH

Platyconin (**1**), a poly-acylated anthocyanin, is a major pigment in bluish-purple petal of Chinese bellflower (*Platycodon grandiflorus*).[1)] By HPLC analysis of the extract of fresh petal, seven minor anthocyanins were found. Compounds **3**, **4**, **5** and **7** were directly isolated by preparative HPLC from crude pigments purified by Amberlite XAD-7 LC, and **6a** and **6b** were separated by a recycle HPLC system. Structure of their pigments was determined d by ESI-MS and NMR analysis. **5**, **6a**, **6b** and **7** were new pigments. **2** was identified with comparison of alkaline hydrolysis product of **1**. All the pigments in a Chinese bellflower was revealed.

1) T. Goto et al. *Tetrahedron Lett*., **24**, 2181-2184 (1983)

Platycodon grandiflorus, Platyconin, poly-acylated anthocyanin

発表責任者：吉田久美（yoshidak@i.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：2G01-05
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 09:00～ ミーティングルーム G

イネの生産する推定 methoxy-5-deoxystrigol 異性体の同定
Identification of a putative methoxy-5-deoxystrigol isomer produced by rice (*Oryza sativa*)
谷口 浩規[1]、謝 肖男[2]、北岡 直樹[3]、小林 峻大[4]、増口 潔[4]、山口 信次郎[4]、○秋山 康紀[1] ([1]阪府大院・生命環境、[2]宇都宮大・バイオ、[3]北大院農、[4]京大化研)
Hiroki Taniguchi[1], Xiaonan Xie[2], Naoki Kitaoka[3], Takahiro Kobayashi[4], Kiyoshi Mashiguchi[4], Shinjiro Yamaguchi[4], ○Kohki Akiyama[1] ([1]Grad. Sch. of Life & Environ. Sci., Osaka Pref. Univ., [2]Ctr. for Biosci. Res. & Educ., Utsunomiya Univ.,, [3]Grad. Sch. of Agri., Hokkaido Univ, [4]Inst. Chem. Res., Kyoto Univ.)

植物アポカロテノイドであるストリゴラクトン(strigolactone, SL) は根圏情報物質としてアーバスキュラー菌根菌や根寄生雑草に対する宿主シグナルとして機能するだけでなく，地上部の枝分かれなどを制御する内生ホルモンとしても働く。これまでに約 30 種の SL が天然から同定されているが，生産量の少なさと SL 固有の不安定さのためにスペクトル解析を行うのに充分な量を単離することが極めて困難であり，未単離・未同定のものが数多く残されている。イネ (*Oryza sativa*)の生産する既知 SL として orobanchol, orobanchyl acetate, 7-oxoorobanchyl acetate, そして 4-deoxyorobanchol が同定されている。これらに加えて methoxy-5-deoxystrigol (MeO-5DS) 異性体と推定される 3 つの新規 SL をイネは生産していることが LC-MS/MS 分析により明らかにされている。これら 3 つの推定 SL は分子量が 360 であり(*m/z* 361 $[M+H]^+$)，メタノールの脱離による *m/z* 329 のフラグメントイオンを含む同一のマススペクトルを示す。これまでに我々は 5DS の AB 環の 4 位, 5 位, 6 位, 7 位, および 9 位に水酸基がそれぞれ置換した 5DS 誘導体を化学合成し，LC-MS/MS や GC-MS 解析を行ったが，すべてイネの MeO-5DS 異性体と一致しないことを確認している。そこで今回，同じ分子量とメトキシ構造を持つオキソカーラクトン酸メチル（methyl oxocarlactonoate, oxoMeCLA）について一連のカルボニル基位置異性体を合成し，それらの MeO-5DS 異性体との同一性について調べた。3-oxoMeCLA は Dieckmann らの方法を適用し，アセタール保護 vinylstannane と vinyl iodide との Stille カップリング，続くアセタール脱保護により合成した。2-, 4-, 16-oxoMeCLA は oxovinylstannane と vinyl iodide を Stille カップリングすることにより合成した。4-oxoMeCLA は 4-hydroxycarlactone の MAX1 酵素酸化，ジアゾメタンによるメチル化，続く Dess-Martin 酸化によっても調製した。18-oxoMeCLA は 18-hydroxyMeCLA を Dess-Martin 酸化して調製した。これら合成した oxoMeCLA について，水道水を用いて水耕栽培したイネの根分泌物の酢酸エチル可溶中性画分中に含まれる MeO-5DS 異性体と LC-MS/MS 分析による比較を行ったところ，3 つの MeO-5DS 異性体のうち，1 つが合成標品と保持時間およびマススペクトルが一致することが分かった。現在，さらに詳細な解析を行っている。

To identify three putative methoxy-5-deoxystrigol isomers produced by rice (*Oryza sativa*), we synthesized a series of methyl oxocarlactonoate isomers by chemical and enzymatic methods and compared the retention time and mass spectra with those of the natural putative strigolactone isomers by LC-MS/MS analysis.

strigolactone, rice, *Oryza sativa*

発表責任者：秋山康紀（akiyama@biochem.osakafu-u.ac.jp）

講演番号：2G01-06
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 09:00～ ミーティングルーム G

溶解度分別法に基づくサイコサポニン単離法の検討

Application of solubility-based separation method for saikosaponins

○高橋 正和、上田 奈穂、片野 肇 (福井県立大学)
○Masakazu TAKAHASHI, Naho UEDA, Hajime KATANO (Fukui Pref. Univ.)

天然物化合物の機能解析に必要十分量の活性化合物を確保するには、簡便な精製手法が有益である。

我々はこれまでに市販の粗精製大豆サポニンを 30%アセトン水溶液（アセトン–水混合溶媒）で処理することによって、迅速簡便な B 型大豆サポニン精製法を確立し、さらには大豆全粒粉末メタノール抽出物をホウ砂水溶液処理に供することで、cis-diol 構造を糖鎖部分に有する大豆サポニン分子種を選択的に濃縮単離する手法を開発している（*Anal. Sci.* 2015, 2019）。本研究では、これらの溶解度分別に基づく単離法を他の天然物化合物へ拡張するための足掛かりとして、サイコサポニンの検討を行った。まずサイコ（柴胡）粉末から種々の溶媒による抽出を検討した。各種アルコール・アセトニトリル・アセトンなどを検討した結果、メタノールによる効率的なサイコサポニン抽出が確認された。また溶媒抽出時に高周波加熱をかけたマイクロウエーブ抽出法を試した結果、やはりメタノールにおいて最も高い抽出効率が確認された。マイクロウエーブ抽出ではプロパノール・ブタノール・アセトン・アセトニトリル抽出物においてもサイコサポニンが確認されたことから、生薬有効成分であるサイコサポニンの高い熱安定性が示唆された。なお、大豆サポニン迅速簡便精製において 30%アセトン水溶液が有用であったことから、柴胡粉末メタノール抽出物を様々な濃度のアセトン水溶液で処理したところ、溶解度分別法によるサイコサポニンの効率的単離には、30%アセトンよりも 100%アセトンが優れており、おもにサイコサポニン a, c を含む標品が得られることが示された。

以上より、溶解度分別法の適用によって柴胡粉末から不純物を減じたサイコサポニン標品を調製可能であることが示され、その後の逆相 HPLC による完全精製に有益であることが示唆された。

Solubility-based separation method is useful for rapid and efficient isolation of specific soyasaponin molecules (*Anal. Sci.* 2015, 2019). Thus, isolation of saikosaponin samples was investigated by solubility-based separation method in this study. When the powder of saiko was extracted with various media such as alcohols, acetonitrile and acetone, methanol showed the best extraction efficiency. In addition, high level heat-stability of saikosaponin was suggested by microwave extraction (850W, 30 m). When methanol extract of saiko powder was treated with 100% acetone, saikosaponins a and c were mainly obtained. Thus, solubility-based separation method was suggested to be useful for selective isolation of specific saikosapoinin compounds.

saikosaponin, solubility-based separation, microwave extraction

講演番号：2G01-07
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 09:00～ ミーティングルーム G

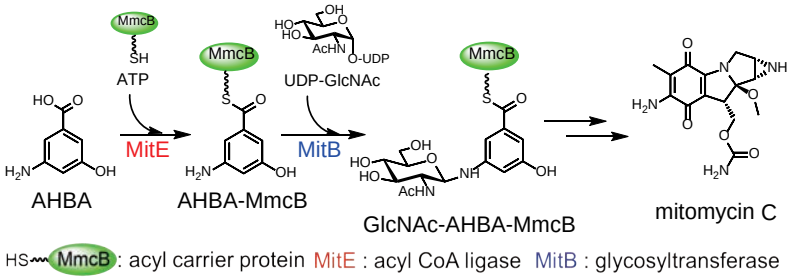
抗腫瘍抗生物質マイトマイシンの生合成解析
Biosynthesis of the antitumor antibiotics mitomycins

○中川 陽[1]、小笠原 泰志[2]、大利 徹[2]（[1]北大院総化、[2]北大院工）
○ Yo NAKAGAWA[1], Yasushi OGASAWARA[2], Tohru DAIRI[2] ([1]Grad. Sch. Chem. Sci. Eng., Hokkaido Univ., [2]Grad. Sch. Eng., Hokkaido Univ.)

マイトマイシンは、放線菌 *Streptomyces ardus* が生産する抗腫瘍抗生物質であり、ベンゾキノン、ピロリジジン、アジリジンが縮環した四環性ミトサン骨格を持つ。標識前駆体の投与実験からミトサン骨格は、3-amino-5-hydroxybenzoic acid (AHBA) と D-glucosamine から生合成されることが示されていたが、骨格形成反応は未解明であった。最近当研究室では、その初発段階について組換え酵素を用いた *in vitro* 実験で、AHBA がアシル CoA リガーゼ (MitE) によってアシルキャリアタンパク質 (ACP) である MmcB にロードされ、続く MitB によるグリコシル化反応で GlcNAc-AHBA-MmcB が生合成されることを見出した (下図)[1]。本研究では、大腸菌を宿主にミトサン骨格形成反応を逐次 *in vivo* で再構築し、生合成の解明を目指した。

MitB 以降の反応も MmcB 上で進行すると予想される。そこで、大腸菌で最大８つの遺伝子を共発現可能な Duet-1 ベクターを用いて、Hit-tag 融合 *mmcB* を他の修飾酵素遺伝子と共に発現し、MmcB 結合型中間体の取得を行った。初めに、*mitB*、*mitE*、*mmcB* および *sfp* (ホスホパンテテイニル化酵素) を共発現した形質転換体を AHBA 添加条件下で培養した。集菌後 MmcB を精製し、LC-MS 分析したところ、GlcNAc- AHBA-MmcB の生産が確認された。現在、次の反応への関与が予想される遺伝子を追加導入して生成物解析を行っている。

Mitomycins, produced by *Streptomyces* strains, are potent anticancer antibiotics that comprise an aziridine ring fused to a tricyclic mitosane core. Recently, we reported *in vitro* characterization of three proteins, MmcB (acyl carrier protein), MitE (acyl CoA ligase), and MitB (glycosyltransferase) involved in mitosane core formation (Figure).[1] In this study, we reconstituted the early biosynthetic pathway of mitomycins in *Escherichia coli* and analyzed MmcB-tethered biosynthetic intermediate by LC-MS. When *mmcB* (His-tagged) was coexpressed with *sfp* (phosphopantetheinyl transferase), *mitE*, and *mitB* in the presence of AHBA, GlcNAc-AHBA-MmcB formation was observed. We currently investigate the next reaction step by coexpression of additional genes.



[1] Y. Ogasawara et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **29**, 2076 (2019).

acyl carrier protein, antibiotic, biosynthesis

発表責任者：大利徹（dairi@eng.hokudai.ac.jp）

講演番号：2G01-08
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 09:00～ ミーティングルーム G

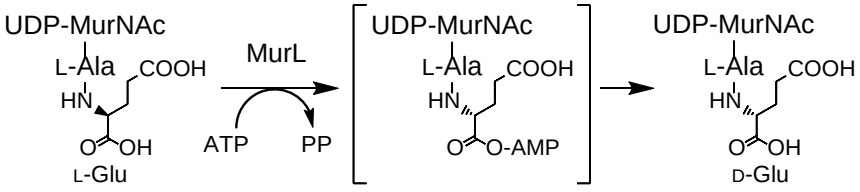
新規 ATP 依存ペプチドエピメラーゼ MurL の反応機構解析

Reaction mechanism of ATP-dependent peptide epimerase MurL

○中尾 優文[1]、小笠原 泰志[2]、佐藤 康治[2]、大利 徹[2] ([1]北大院総化、[2]北大院工)
○Masafumi NAKAO[1], Yasushi OGASAWARA[2], Yasuharu SATOH[2], Tohru DAIRI[2] ([1]Grad. Sch. Chem. Sci. Eng., Hokkaido Univ., [2]Grad. Sch. Eng., Hokkaido Univ.)

ペプチドグリカンは、ほとんどの真正細菌の細胞膜の外側に見られる高分子化合物であり、細胞の形態維持や浸透圧からの保護など生命維持に重要な役割を果たす。当研究室では最近、植物病原菌の *Xanthomonas* 属細菌を含む一部の微生物のみが利用する新規生合成経路を見出した[1]。本経路では、MurD2 が UDP-MurNAc-L-Ala に L-Glu を付加した後、MurL による末端 L-Glu 残基のエピメリ化が進行する。MurL は既知の酵素と相同性が全くなく、反応に ATP を必要とする初めてのエピメラーゼであり反応機構が興味深い。MurL の反応では基質である UDP-MurNAc-L-Ala-L-Glu に対して 1 当量の ATP が消費され AMP が副生することから、基質の末端 L-Glu 残基のα-カルボキシ基がアデニル化されたアシルアデニル酸中間体を経由すると予想した。一般にアシルアデニル酸は、ヒドロキシルアミンの存在下で対応するヒドロキサム酸へ変換される。そこで、MurL の反応をヒドロキシルアミン存在下で行い LC-MS や NMR で分析した。その結果、ヒドロキサム酸と推定される化合物が検出され、反応がアシルアデニル酸中間体を経て進行することが示唆された。

Peptidoglycan is a component of bacterial cell walls and plays an important role in maintaining cell integrity. Recently, we identified an alternative pathway of peptidoglycan biosynthesis operating in some bacteria including the plant pathogen, *Xanthomonas oryzae*.[1] In this pathway MurL, previously annotated as a hypothetical protein, catalyzed epimerization of L-Glu in UDP-MurNAc-L-Ala-L-Glu. Interestingly, MurL required one equivalent of ATP for the activity and generated AMP as a byproduct. Because MurL is the first example of an epimerase that requires ATP, we investigated its reaction mechanism. Considering that AMP was formed during the reaction, we proposed that reaction initiates with the adenylation of a carboxyl group in UDP-MurNAc-L-Ala-L-Glu to form an acyl adenylate intermediate. Because acyl adenylates are known to convert to the corresponding hydroxamic acids in the presence of hydroxylamine, MurL was incubated with the substrate in the presence of hydroxylamine. LC-MS and NMR analysis revealed formation of the hydroxamic acid.



[1] Y. Feng et al. *J. Am. Chem. Soc.* **139**, 4243 (2017).

enzyme, epimerase, peptidoglycan

発表責任者：大利徹（dairi@eng.hokudai.ac.jp）

講演番号：2G01-09
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 09:00～ ミーティングルーム G

超好熱性アーキア由来ホスホメバロン酸デヒドラターゼの活性中心に存在する鉄硫黄クラスターの解析

Analysis of the iron-sulfur cluster present in the active center of mevalonate phosphate dehydratase from hyperthermophilic archaea

○米山 睦[1]、三野 広幸[2]、保野 陽子[3]、品田 哲郎[3]、吉村 徹[1]、邊見 久[1]([1]名大院・生命農、[2]名大院・理、[3]大阪市大院・理)
○ Mutsumi KOMEYAMA[1], Hiroyuki MINO[2], Yoko YASUNO[3], Tetsuro SHINADA[3], Tohru YOSHIMURA[1], Hisashi HEMMI[1] ([1]Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya Univ., [2]Graduate School of Science, Nagoya Univ., [3]Graduate School of Science, Osaka City Univ.)

イソプレノイドは自然界における最大の天然有機化合物群であり、現在までに 80,000 種以上が報告されている。メバロン酸（MVA）経路はイソプレノイド前駆体を合成する経路のひとつである。我々は近年、超好熱性アーキア *Aeropyrum pernix* より、大部分のアーキアが保有していると考えられる新奇変形 MVA 経路を発見した。以降、この経路をアーキア型 MVA 経路と称する。本研究の対象であるホスホメバロン酸デヒドラターゼ（PMDh）は、このアーキア型 MVA 経路において 5-ホスホメバロン酸（MVA5P）から 5-ホスホ-*trans*-アンヒドロメバロン酸（tAHMP）を産生する脱水酵素である。

PMDh はアコニターゼスーパーファミリーに属する酵素である。同ファミリーに属する酵素の多くは[4Fe-4S]鉄硫黄クラスターを活性中心に持ち、加水・脱水反応を触媒することが知られている。先行研究より、*A. pernix* 由来 PMDh（ApPMDh）も活性中心に鉄硫黄クラスターをもつことが示唆されていたが、その詳細は未解明であった。本研究ではその活性中心の構造解明を目的とした。

まず、ApPMDh の変異体解析を行い、鉄硫黄クラスターに配位するアミノ酸残基の特定に取り組んだ。C122A、C297A、C356A の 3 つの変異体では、鉄硫黄クラスターに特徴的であるとされる 410 nm 付近の吸光度が減少し、活性も大幅に減少することが判明した。このことから ApPMDh は 3 つのシステイン残基に配位された鉄硫黄クラスターをもつことが示唆された。次に、この活性中心の性質をより詳細に調べるために電子常磁性共鳴（EPR）分析を試みた。結果として $Na_2S_2O_4$ で還元した ApPMDh の解析で、g=1.93, 1.83, 1.81 の鉄硫黄クラスター様シグナルを得ることが出来た。温度依存性などの結果も考慮すると、これは[4Fe-4S]$^{1+}$の鉄硫黄クラスターに由来すると考えられる。以上の結果は、ApPMDh がアコニターゼスーパーファミリーに属する他の酵素と同様に、3 つのシステイン残基で配位された[4Fe-4S]型の活性中心を持つことを示している。

This study targets mevalonate phosphate dehydratase (PMDh), which produces *trans*-anhydro-mevalonate phosphate (tAHMP) in the archaeal mevalonate pathway. PMDh belongs to the aconitase superfamily composed of iron-sulfur enzymes, but the details of its active center have not been elucidated. Here, we report the results from mutagenetic analysis and electron paramagnetic resonance (EPR) analysis of *Aeropyrum pernix* PMDh. These results suggest the presence of a [4Fe-4S] center, which is likely coordinated with three cysteine residues. These properties are similar to those of other aconitase-superfamily members.

mevalonate pathway, aconitase, iron-sulfur cluster

講演番号：2G01-10
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 09:00～ ミーティングルーム G

アーキア型メバロン酸経路の鍵酵素ホスホ-*trans*-アンヒドロメバロン酸デカルボキシラーゼの酵素学的研究

Enzymatic study of *trans*-anhydromevalonate phosphate decarboxylase, a key enzyme of the archaeal mevalonate pathway

○松嶋 夏海[1]、栗木 莉子[1]、保野 陽子[2]、品田 哲郎[2]、吉村 徹[1]、邊見 久[1]([1]名大院農、[2]大阪市大院理)
○ Natsumi MATSUSHIMA[1], Riko KURIKI[1], Yoko YASUNO[2], Tetsuro SHINADA[2], Tohru YOSHIMURA[1], Hisashi HEMMI[1] ([1]Nagoya Univ., [2]Osaka City Univ.)

メバロン酸 (MVA) 経路はイソプレノイドの生合成前駆体を供給する経路の一つである。当研究室で近年発見されたアーキア型 MVA 経路において、5-ホスホ-*trans*-アンヒドロメバロン酸 (tAHMP) からイソペンテニルリン酸への変換は、tAHMP デカルボキシラーゼ (AMPD) によって触媒される。同酵素は特殊なフラビン補酵素であるプレニル化 FMN (prFMN) を活性に要求する。我々はすでに、超好熱性アーキア *Aeropyrum pernix* 由来 AMPD (ApeAMPD) の大腸菌での発現と精製、および prFMN の添加によるホロ化に成功している。

アーキア型 MVA 経路遺伝子のホモログを全て有する生物を比較ゲノムデータベースを用いて広く探索したところ、メタゲノム解析によって再構成された全ゲノム配列が報告されている未培養真正細菌、*Candidatus* Promineofilum breve が候補に挙がった。昨年度大会での講演において我々は、大腸菌体内でのアーキア型 MVA 経路の再構成により同菌由来の AMPD ホモログ (PbrAMPD) の活性を証明した。本発表では *in vitro* での活性測定により、ApeAMPD と PbrAMPD の様々な特性の違いを調べた結果について報告する。

The Mevalonate (MVA) pathway is one of the pathways that supply biosynthetic precursors for isoprenoids. In the archaeal MVA pathway recently discovered in our laboratory, the conversion of 5- *trans*- anhydromevalonate phosphate (tAHMP) to isopentenyl phosphate is catalyzed by tAHMP decarboxylase (AMPD). AMPD requires a unique flavin coenzyme, prenylated FMN (prFMN), for activity. We have succeeded in the recombinanat expression, purification, and reconstitution with prFMN of AMPD from a hyperthermophilic archaeon *Aeropyrum pernix* (ApeAMPD).

Organisms possessing all the homologues of the archaeal MVA pathway genes were searched from a comparative genome database. As a result, *Candidatus* Promineofilum breve, an uncultured bacterium whose entire genome sequence reconstituted from metagenome analysis had been reported, was selected as a candidate. At last year's meeting, the activity of AMPD homologue from P. brave (PbrAMPD) was proven by reconstitution of the archaeal MVA pathway in *E. coli* cells. In this study, we report the differences in various properties of ApeAMPD and PbrAMPD, which were revealed by measuring their *in vitro* activities.

mevalonate pathway, UbiD family decarboxylase, prenylated FMN

講演番号：2G01-11
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 09:00～ ミーティングルーム G

生合成環化酵素を用いた新規ドウモイ酸類縁体の生産

Production of domoic acid analogs using biosynthetic enzyme

○前野 優香理[1]、小瀧 裕一[2]、寺田 竜太[3]、長 由扶子[1]、此木 敬一[1]、山下 まり[1]([1]東北大農、[2]福島学院大、[3]鹿児島大連合農)
○Yukari MAENO[1], Yuichi KOTAKI[2], Ryuta TERADA[3], Yuko CHO[1], Keiichi KONOKI[1], Mari YOTSU-YAMASHITA[1] ([1]Tohoku Univ. Agr., [2]Fukushima college, [3]Kagoshima Univ.)

ドウモイ酸 (Domoic acid, DA) は、神経細胞のイオンチャネル型グルタミン酸受容体のアゴニストである。我々は DA 生産紅藻から Fig. 1 に示した 2 種を含む 6 種の新規 DA 類縁体を単離・構造決定した。しかし、それらの類縁体は極微量しか得られなかったため、生理活性は未だ不明であった。[1] 我々の報告の後に、Moore らのグループにより DA の生合成遺伝子が同定された。[2] 本研究では、DA 類縁体の構造活性相関研究を目的として、DA 生合成環化酵素 DabC を利用した新規 DA 類縁体生産系を構築し、我々が単離した微量な天然型 DA 類縁体や非天然型新規 DA 類縁体の調製を目指した。

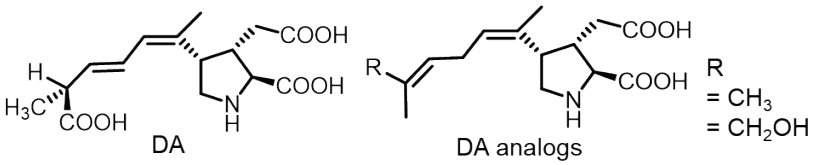


Fig. 1. Structures of DA and DA analogs isolated from red alga.[1]

DabC を大腸菌で発現させ、その培養液中に化学合成した開環型基質を添加し、環化産物への変換を試みた結果、添加した開環型基質が環化産物へと変換されたことが確認された。また、培養条件の最適化により、環化産物の収率を向上させることに成功した。本生産系を用いることで、天然には極微量にしか存在しない二種の DA 類縁体を得ることができた。現在、非天然型の DA 類縁体についても基質を化学合成し、構築した生産系による変換実験を行っている。

Domoic acid (DA) is an agonist of ionotropic glutamate receptors in neuron. Although we isolated six new DA analogs from DA-producing red alga, their biological activities are remaining unknown because of limited amount of them. After we reported, Moore's group identified biosynthetic gene cluster of DA. In this study, we developed a preparation method of such low abundant natural analogs and new analogs of DA for SAR study of them using a DA's biosynthetic cyclase, DabC.

At first, we attempted cyclization of linear substrates by adding them to the culture medium of *E. coli* expressed DabC. Next, we optimized the culture condition to improve the efficiency of this enzyme. As the results, some linear substrates were successfully cyclized. Furthermore, the conversion efficiency was improved under the modified conditions. We are going to prepare a few new unnatural DA analogs using this system.

[1] Maeno, Y. and Yotsu-Yamashita, M. *et al*., *Sci. Rep*. **2018**, *8*, 356.
[2] Brunson, J. K.; McKinnie, S. M. K. and Moore, B. S. *et al*., *Science* **2018**, *361*, 1356–1358.

domoic acid, biosynthetic enzyme, chemo-enzymatic synthesis

発表責任者：山下まり（mari.yamashita.c1@tohoku.ac.jp）

講演番号：2G01-12
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 09:00～ ミーティングルーム G

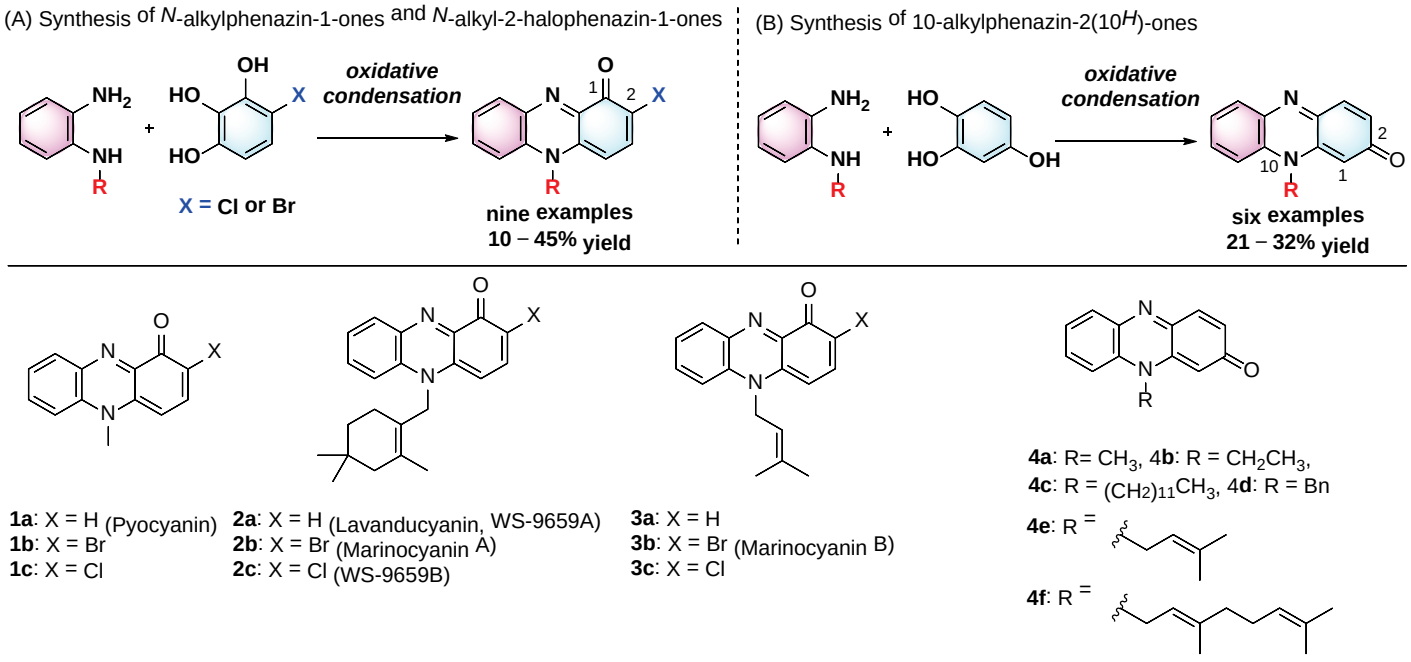
フェナジノン類の網羅的合成法と活性・物性評価

Synthesis, cytotoxicity and photochemical properties of phenazinones

○加茂 翔伍[1,2]、古波津 春希[1]、古田 将照[1]、細貝 拓也[3]、友重 秀介[1]、大金 賢司[1]、倉持 幸司[1]([1]東理大理工、[2]星薬大、[3]産総研・物質計測)
○Shogo Kamo[1,2], Haruki Kohatsu[1], Masateru Furuta[1], Takuya Hosokai[3], Shusuke Tomoshige[1], Kenji Ohgane[1], Kouji Kuramochi[1] ([1]Tokyo Univ. of Science, [2]Hoshi Univ., [3]AIST)

フェナジノンは、カルボニル基の位置の違いで *N*-alkylphenazin-1-one と 10-alkylphenazin-2(10*H*)-one に分類される。我々はこれらフェナジノン類を網羅的に合成する方法を開発した。まず、*N*-アルキルベンゼン-1,2-ジアミンとピロガロールあるいはハロゲン化ピロガロールを酸素雰囲気下でカップリングさせ、*N*-alkylphenazin-1-one 骨格を構築する方法を開発した（**図** (A)）。この合成法により pyocyanin (**1a**)、lavanducyanin (WS-9659 A) (**2a**)、WS-9659 B (**2c**)、marinocyanins A (**2b**), B (**3b**)を含む、合計 9 種類の化合物を合成することに成功した。この合成法は *N*-alkylphenazin-2(10*H*)-one の合成にも見事に適応できた（**図** (B)）。*N*-アルキルベンゼン-1,2-ジアミンと 1,2,4-benzenetriol をカップリングさせ、6 種類の 10-alkylphenazin-2(10*H*)-one (**4a-f**) を合成できた。合成化合物について、ヒト肺がん由来 A549 細胞と正常ヒト線維芽由来 MRC-5 細胞に対する細胞毒性を評価したところ、化合物 **1a** と **1c** にがん細胞選択的毒性を確認した。一方、*N*-methylphenazin-2(10*H*)-one には特異な蛍光特性を見出した。本発表ではこれらの研究成果を詳細に報告する。

図．研究概要 (A) *N*-Alkylphenazin-1-one と (B) 10-alkylphenazin-2(10*H*)-one の合成法



In this presentation, a synthesis of *N*-alkylphenazin-1-ones and 10-alkylphenazin-2(10*H*)-ones will be presented. These compounds were easily prepared by oxidative coupling between *N*-alkylbenzene-1,2-diamines and 1,2,3-benzenetriol (or 4-halo-1,2,3-benzenetriol) or 1,2,4-benzenetriol. Their cytotoxicity and photochemical properties will be also presented.

【参考文献】(1) Kohatsu, H. and Kamo, S. *et al. Org. Lett.* **2019**, *21*, 7311. (2) Kohatsu, H. *et al. ACS Omega* **2020**, *5*, 27667.

phenazinone, total synthesis, oxidative condensation

講演番号：2G01-13
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 09:00～ ミーティングルーム G

有機化学的アプローチによるニホンライチョウの保全研究

Contribution to Ptarmigan Conservation by Organic Chemistry

○倉持 幸司[1]、岡 咲幸[1]、國場 遼[1]、坪井 希[1]、保坂 啓介[1]、土田 さやか[2]、小林 篤[3]、松林 誠[4]、牛田 一成[2] ([1]東理大・理工、[2]中部大・創発学術院、[3]環境省・信越自然環境事務所、[4]阪府大院・生命環境)

○Kouji Kuramochi[1], Sayuki Oka[1], Ryo Kuniba[1], Nozomi Tsuboi[1], Keisuke Hosaka[1], Sayaka Tsuchida[2], Atsushi Kobayashi[3], Makoto Matsubayashi[4], Kazunari Ushida[2] ([1]Tokyo Univ. of Science, [2]Chubu Univ., [3]Ministry of the Environment, [4]Osaka Prefec. Univ.)

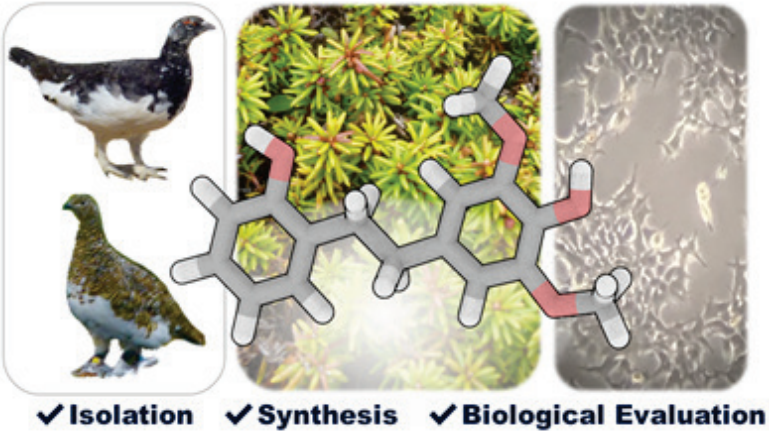
本発表では、絶滅危惧種であるニホンライチョウの飼育や保全に貢献する有機化学・天然物化学に関する研究を紹介する。

特別天然記念物のニホンライチョウは絶滅危惧ＩＢ類（環境省第 4 次レッドリスト）に指定されている。生息域外保全として、これまで動物園などで飼育した個体を野生に放つ取り組みが行われてきたが、成功例は皆無である。その一因が餌の問題である。野生のニホンライチョウは高山植物を常食にしているのに対し、飼育のニホンライチョウは豊富な栄養素を含む餌で育てられている。つまり、栄養価の高い餌で育てたニホンライチョウを野に放ったとしても、植物に含まれる栄養素を効率的に代謝・吸収できなかったり、毒性成分を分解できずに、野外で生き残ることができない。

我々はニホンライチョウが餌とする高山植物に含まれる二次代謝産物を解析し、それら代謝産物の活性・機能などの物性を評価することを計画した。本研究では代謝産物の生物活性、腸内分解、代謝、人工飼料への添加などを詳しく精査するため、有機合成により物量を確保することとした。

本発表では、野生ガンコウランに含まれるビベンジルの単離・構造決定、化学合成、生物活性評価に関する研究などを紹介する。

Japanese rock ptarmigans frequently eat the leaves and fruits of *Empetrum nigrum* var. *japonicum*. Our group isolated, characterized, and synthesized a bibenzyl derived from this plant. This compound displayed cytotoxic activity against human cancer cells (HCT116 and Hela cells) and leukemia cells (HL-60 cells). The present study suggests that this plant serves as a source of biologically active natural products. Also, our findings provide information on the secondary metabolites in the diet of Japanese rock ptarmigans.



【図】ガンコウラン由来のビベンジルの単離・合成・生物活性.
(引用：*Biosci. Biotech Biochem.* **2020**, *84*, in press. Doi: 10.1080/09168451.2019.1662279)

bibenzyl, ptarmigan, diet

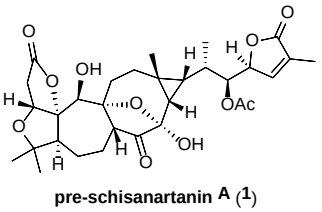
発表責任者：倉持幸司（kuramoch@rs.tus.ac.jp）

講演番号：2G01-14
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 09:00～ ミーティングルーム G

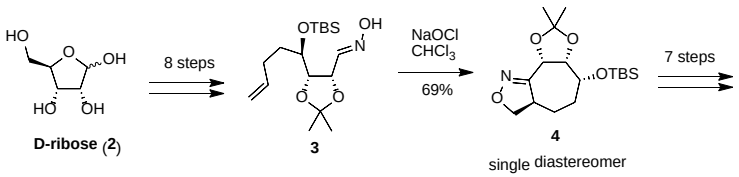
Pre-schisanartanin A の不斉全合成研究

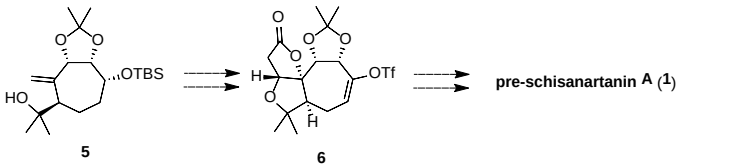
Synthetic studies toward asymmetric total synthesis of pre-schisanartanin A

○八木田 凌太郎、塚野 千尋、入江 一浩（京大院農）
○Ryotaro YAGITA, Chihiro TSUKANO, Kazuhiro IRIE (Kyoto Univ.)



Pre-schisanartanin A (**1**) は, 2007 年に Sun らによって朝鮮五味子 *Schisandra chinensis* より単離されたノルトリテルペノイドであり，抗 HIV 活性が報告されている (EC_{50} = 13.81 μg/ mL)[1]. 構造的特徴としては 3, 5, 7, 8 員環が縮環した新奇五環性骨格と，シクロプロパン環の主鎖置換基が同一面に位置している全シス置換シクロプロパン構造が挙げられる．我々はその特異な構造と生物活性に興味をもち，本天然物の全合成研究に着手した．





全合成にあたって，**1** の 7 員環構造を D-リボース (**2**) から [3+2] 付加環化反応を鍵として効率的に構築することを計画した．D-リボースから 8 工程で合成したオキシム **3** を次亜塩素酸ナトリウムで処理した．[3+2] 付加環化反応は円滑に進行し，ジアステレオ選択的にイソオキサゾリン **4** を得ることに成功した．続く 7 工程でアルコール **5** へと誘導化し，**6** への変換を検討している．本発表では，オキシム **3** の [3+2] 付加環化反応と続く **6** への誘導化の詳細を説明する．

Pre-schisanartanin A (**1**), which belongs to *Schisandra* nortriterpenoid, was isolated from *Schisandra chinensis* by Sun and coworkers in 2007.[1] Its structure is characterized by a novel pentacyclic skeleton with a 3-5-7-8-membered ring system and an all-*cis* substituted cyclopropane, in which the main chain substituents of the cyclopropane ring are located on the same plane. It demonstrates anti-HIV activity with an EC_{50} = 13.81 μg/ mL. We have started the total synthesis of **1** because of its unique skeleton and important biological activity.

We have succeeded in the synthesis of isoxazoline **4** by a [3+2] cycloaddition reaction of oxime **3**, which was prepared from D-ribose (**2**). Herein, we will present a detail of this [3+2] cycloaddition reaction and further transformation toward compound **6**, a left fragment of **1**.

1. Huang, S. X. *et al.*, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 2079.

total synthesis, triterpene, anti-HIV activity

発表責任者：塚野　千尋（tsukano.chihiro.2w@kyoto-u.ac.jp）

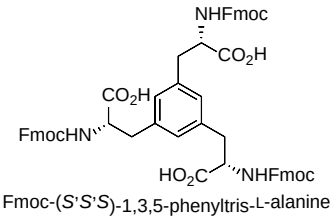
講演番号：2G01-15
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 09:00～ ミーティングルーム G

病原性凝集ペプチドの 3 量体モデルのリンカーとなるアルキル架橋トリス-α-アミノ酸の合成

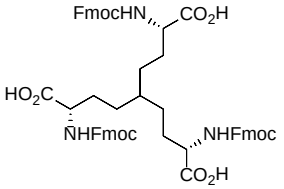
Synthesis of alkyl bridged-tris-α-amino acids as linkers for trimer models of pathogenic aggregative peptides

○内野 歩美[1]、塚野 千尋[1]、今本 恒雄[2]、入江 一浩[1]（[1]京大院農、[2]千葉大院理）
○Ayumi UCHINO[1], Chihiro TSUKANO[1], Tsuneo IMAMOTO[2], Kazuhiro IRIE[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Chiba Univ.)

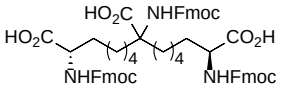
アルツハイマー病 (AD)、パーキンソン病などの神経変性疾患の発症には病原性タンパク質の凝集が関与しており、その毒性本体は 2 量体および 3 量体を最小基本単位とするオリゴマーであると指摘されている。AD に関与するアミロイド β (Aβ) タンパク質の毒性オリゴマーに特徴的な構造の解明を目指して、ビス-α-アミノ酸をリンカーとした化学的に単一な Aβ の 2 量体モデルが合成・構造機能解析されてきた。一方、1,3,5-phenyltris-L-alanine などの既知のトリス-α-アミノ酸はアミノ酸の α 炭素間の架橋部に芳香環を含み柔軟性が低いため、毒性を示す 3 量体 Aβ の構造の模倣には適さない可能性が示唆されている[1]。



Fmoc-(*S*,*S*,*S*)-1,3,5-phenyltris-L-alanine



Fmoc-(*S*,*S*,*S*)-*tert*-butyltris-L-alanine (**1**)



Fmoc-(*S*,*S*)-α,α-di-L-homonorleucyl-L-glycine (**2**)

我々はこの問題を解決するため、アルキル鎖で架橋されたより柔軟性の高い 2 種類の新規トリス-α-アミノ酸の Fmoc 保護体を設計した。具体的には 3 回対称の Fmoc-(*S*,*S*,*S*)-*tert*-butyltris-L-alanine (**1**) と直鎖状の Fmoc-(*S*,*S*)-α,α-di-L-homonorleucyl-L-glycine (**2**) である。今回、トリス-α-アミノ酸 **1** および **2** を、Horner-Wadsworth-Emmons 反応と Rh 触媒による不斉水素化反応を鍵として、それぞれ 14 段階、10 段階にて合成することに成功した。

Dimers and trimers of aggregative peptides involved in neurodegenerative diseases are minimum units of their toxic oligomers. Regarding amyloid β (Aβ) peptides involved in Alzheimer's disease, dimer models cross-linked with a bis-α-amino acid have been synthesized and characterized. On the other hand, known tris-α-amino acids containing aromatic rings may have several limitations to mimic toxic Aβ trimers because of their low flexibility[1]. To address these issues, C_3-symmetric and linear Fmoc-protected tris-α-amino acids containing alkyl spacers (**1** and **2**, respectively) were designed as new flexible linkers for trimer models. Herein, we will report the synthesis of **1** and **2** using Horner-Wadsworth-Emmons reaction and Rh-catalyzed asymmetric hydrogenation in 14 and 10 steps, respectively.

1) Irie, Y. *et al.*, *Chem. Commun.* **2019**, *55*, 182–185.

amino acids, amyloid ß peptides, trimer

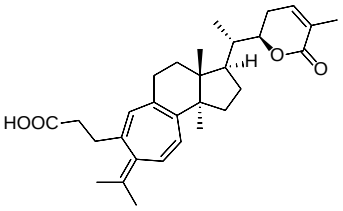
発表責任者：入江一浩（irie.kazuhiro.2z@kyoto-u.ac.jp）

講演番号：2G01-16
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 09:00～ ミーティングルーム G

抗 HIV 活性トリテルペノイド・ランシラクトン C の不斉全合成研究

Synthetic studies toward asymmetric total synthesis of lancilactone C

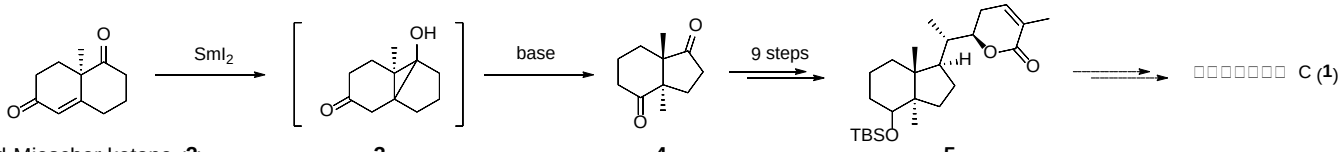
○黒岩 秀崇、塚野 千尋、入江 一浩（京大院農）
○HIDETAKA KUROIWA, CHIHIRO TSUKANO, KAZUHIRO IRIE (Kyoto Univ.)



□□□□□□□ C (**1**)

ランシラクトン C (**1**) は生薬として利用されてきたサネカズラ属の植物 *Kadsura lancilimba* から単離構造決定されたトリテルペノイドである[1]。構造的特徴としては 2 つの第四級炭素を含む連続した不斉中心、シクロヘプタトリエン構造が挙げられる。本化合物は抗 HIV 活性（EC_{50}＝1.4 μg/mL）が報告されているものの、その活性発現機構は不明である。生薬や食品としての利用のある植物から単離された本化合物は毒性の観点からも抗 HIV 薬剤シードとして期待ができ、作用機序の解明が求められる。我々はその重要な生物活性と特徴的な構造に興味をもち、全合成研究を開始した。

全合成に着手するにあたり中心骨格となる核間位第 4 級炭素を有するビシクロ[4.3.0]ノナン骨格を、Wieland-Miescher ケトン (**2**) をヨウ化サマリウムで処理して生じるシクロプロパン **3** の開環を経由して構築することを計画した。反応条件について種々検討した結果、従来の金属リチウム、液体アンモニアを用いる手法[2]より温和な条件で合成に成功した。さらに化合物 **4** から 9 工程で側鎖の不飽和ラクトン環の構築に成功した。本発表では化合物 **4** の合成とその後の誘導化について、詳細を報告する。



Wieland-Miescher ketone (**2**) **3** **4** **5**

Lancilactone C was isolated from *Kadsura lancilimba* which is distributed in east Asia. This compound has contiguous asymmetric carbons including two quaternary carbons and cycloheptatriene structure. Lancilactone C inhibits HIV replication with an EC_{50} value of 1.4 μg/mL, but the mechanism of the inhibition remains elusive. Because of the significant biological activity and unique structure, we have focused on lancilactone C as a synthetic target.

In this study, we have succeeded in the construction of bicyclo[4.3.0]nonane skeleton **4** via formation and ring-opening of cyclopropane **3** from Wieland-Miescher ketone (**2**) using samarium iodide. The detail of the investigation and further transformation of compound **4** into **5** will be reported.

1. Chen, D. F. *et al. J. Nat. Prod.* **1999**, *62*, 94-97.
2. Reusch, W.; Grimm, K.; Yordy, J. D. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 1953-1958.

total synthsis, triterpenoid, anti-HIV activity

発表責任者：塚野　千尋（tsukano.chihiro.2w@kyoto-u.ac.jp）

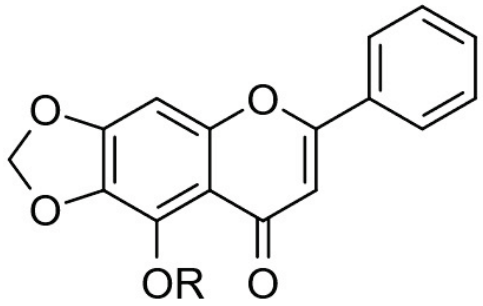
講演番号：2G03-01
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 10:00～ ミーティングルーム G

ホウレンソウ葉における塩化銅ストレス誘導性化合物の同定

Identification of $CuCl_2$-induced compounds in spinach leaves

○鳥井 潤一郎、戸嶋 浩明、長谷川 守文 (茨城大農)
○Junichiro TORII, Hiroaki TOSHIMA, Morifumi Hasegawa (Ibaraki Univ.)

ファイトアレキシン（PA）は病原菌感染時に誘導される抗菌性の二次代謝産物であり、UV や塩化銅処理によっても誘導される。イネ科植物において、近年になって新しい PA が同定されてきており、その構造は従来の予想よりも多様であることがわかってきた。本研究では、イネ科以外の植物における PA の構造の多様性を調べるために、ヒユ科のホウレンソウから新規の PA の同定を目的として、塩化銅ストレス誘導性化合物を探索した。ホウレンソウに塩化銅（II）水溶液を吸収させて誘導処理を行った。処理後のホウレンソウ葉をメタノール抽出し，LC-MS により分析し，未処理試料との比較によって塩化銅ストレス誘導性化合物を探索した。その結果、1 mM 塩化銅水溶液での処理後、72-120 時間に塩化銅誘導性化合物と推定される物質がより強く誘導されることを確認した。1 mM 塩化銅水溶液処理後 72 時間のホウレンソウ葉 400 g をメタノール抽出し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー及び分取 HPLC に供し塩化銅誘導性化合物を単離した。単離した化合物について NMR による構造解析を行い、ヒユ科のケイトウやナス科の *Physalis minima* から同定されている 5-methoxy-6,7-methylenedioxyflavone（**1**）および、すでにホウレンソウの根から *Aphanomyces cochlioides* の遊走子誘引物質として同定されている cochliophilin A(**2**)を同定した。現在、これらの物質がホウレンソウの PA として機能するかを確認するために抗真菌活性試験および病原菌接種による蓄積誘導試験を進めている。



R = CH^3 : 5-methoxy-6,7-methylenedioxyflavone (**1**)
R = H : cochliophilin A (**2**)

To identify new phytoalexins, $CuCl_2$-induced compounds were purified from spinach leaves. $CuCl_2$-induced compounds were highly induced 72-120 hours later after 1 mM $CuCl_2$ treatment. These compounds were isolated from $CuCl_2$-treated spinach leaves, and identified as 5-methoxy-6,7-methylenedioxyflavone (**1**) and cochliophilin A (**2**) by NMR analysis.

phytoalexin, spinach, flavonoid

発表責任者：長谷川守文（morifumi.hasegawa.1@vc.ibaraki.ac.jp）

講演番号：2G03-02
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 10:00～ ミーティングルーム G

ツキヨタケ（*Omphalotus japonicus*）菌糸培養濾液より単離した新規な illudalane 型セスキテルペンについて

New Illudalane-type sesquiterpene Isolated from the Mycelial Culture Filtrate of *Omphalotus japonicus*

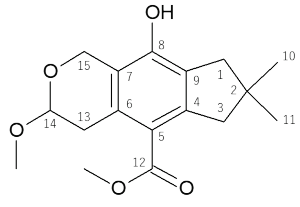
○青木 聡樹[1]、網干 貴子[1,2]、木村 賢一[1,3]、新井 大輔[4]、飯塚 禎明[4]、村山 哲也[1,2]（[1]岩手大院連農、[2]山形大農、[3]岩手大農、[4]やまがたフィールド科学センター）
○Satoki AOKI[1], Takako ABOSHI[1,2], Ken-ichi KIMURA[1,3], Daisuke ARAI[4], Yoshiaki IIZUKA[4], Tetsuya MURAYAMA[1,2] ([1]UGAS, [2]Yamagata Univ., [3]Iwate Univ., [4]FSC)

【Abstract】A new illudalane-type sesquiterpene was isolated from the mycelial culture filtrate of Basidiomycete *Omphalotus japonicus*. The chemical structure was determined with NMR, MS and IR. Known substances illudin B, H, M, S, illudalic acid and gastrodigenin were also isolated.

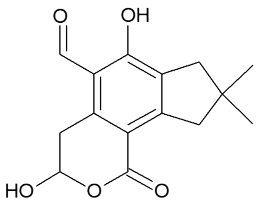
【目的】当研究グループでは未利用キノコを新規化合物探索源とした研究を展開しており、演者らはこれまでにツキヨタケ（*Omphalotus japonicus*）子実体より 6 種の新規セスキテルペン、玄米培地培養物より 1 種の新規ポリイソプレンポリオールを単離しその構造と生理活性を明らかにしてきた。本発表ではツキヨタケ菌糸を液体培地にて振盪培養した際の培養濾液より得られた新規な illudalane 型セスキテルペンについて発表する。

【方法】ツキヨタケ菌糸（YUOJ0825 株）を MPG 培地にて振盪培養し、吸引濾過により得られた培養濾液を酢酸エチルで抽出した。酢酸エチル画分についてシリカゲルカラム並びに HPLC による単離精製を進めたところ化合物 ME1-ME7 を得た。

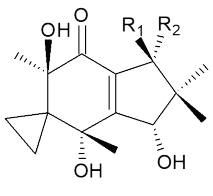
【結果と考察】NMR 及び MS、IR による構造解析の結果、ME1 は illudalane 骨格を有する新規セスキテルペンであった。またそのほかの化合物は、これまで子実体では見られなかった illudin B, H, M, illudalic acid、gastrodigenin の他、子実体及び玄米培地培養物いずれにおいても見られた illudin S であると同定した。従ってツキヨタケは子実体と菌糸で異なる成分を産生しており、また菌糸の培養条件の違いによっても作る成分に違いがあることが示唆された。



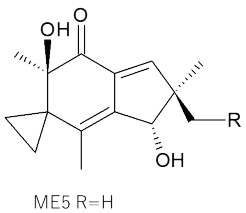
ME1



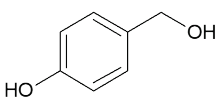
ME2



ME3 R_1=H R_2=OH
ME4 R_1=OH R_2=H



ME5 R=H
ME6 R=OH



ME7

【謝辞】本研究はクラウドファンディングプロジェクト「キノコの知られざる有用性や化学成分の多様性 を探索する！」(academist)からの支援を受けています。特に以下の方々からご支援戴きましたので心よ り御礼申し上げます（敬称略、順不同）。蜂矢 志保実、海江田 陽子、木村 司、阿部 尚美、飯島 明子、 前川 慶之、小波 秀雄、松岡 秀達、梅本 里穂、菊地 武志、他 29 名。

natural products, *Omaphalotus japonicus*, sesquiterpene

講演番号：2G03-03
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 10:00～ ミーティングルーム G

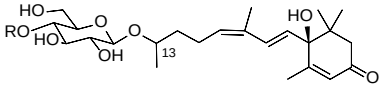
トマト由来の疫病菌無性生殖阻害物質の探索

Search for *Phytophthora* asexual reproduction inhibitors from tomato

○安藤 優花、加藤 史華、小鹿 一 (名大院・生命農)
○Yuka ANDO, Fumika KATO, Makoto OJIKA (Nagoya Univ.)

【背景・目的】

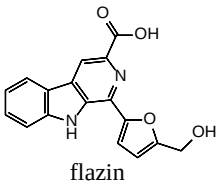
Phytophthora 属植物病原糸状菌である疫病菌は、無性生殖により急速に広がり農作物に甚大な被害を与える。したがってその阻害物質の探索は、疫病菌の防除において非常に重要である。我々は疫病菌の培地として用いた野菜ジュースからこのような活性を持つ lycoside 類(右図)を発見し、トマト由来の成分であることを明らかにした [1)]。今回、新たな無性生殖阻害物質をトマトジュース中から探索した。



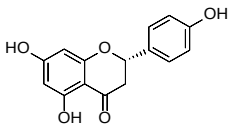
lycosides A ~ D
(R = H or glucose, 13*R* or 13*S*)

【方法・結果】

無性生殖阻害活性検定は次のように行った。サンプルを含む V8 - 寒天培地に、疫病菌 *P. capsici* を接種し、6 日間培養した。コロニーの一部をくり抜き、遊走子嚢（無性胞子）を顕微鏡下で数えて活性の評価を行った。活性物質の抽出は次のように行った。トマトジュース 3.6 L を MeOH 抽出し、抽出物を ODS オープンカラム、さらに HPLC を用いて分離した結果、遊走子嚢の形成を阻害する 2 つの化合物が得られた。NMR により構造解析したところ、flazin と naringenin であることが判明し、阻害活性はそれぞれ IC_{50} ＝ 7.2, 9.9 μM を示した。これは lycoside 類の活性 (IC_{50} ＝ 2.8 ~ 7.5 μM) と同等であった。現在は新たな無性生殖阻害物質の探索を行っている。



flazin



naringenin

Since *Phytophthora* spread rapidly by asexual reproduction and cause severe damage to crops, the search for its inhibitors is important in the control of *Phytophthora*. We previously discovered lycosides with such activity in vegetable juices used as culture medium and found them to be derived from tomatoes [1)]. Here, we investigated new asexual reproduction inhibitors in tomato juice.

MeOH extracts of tomato juice were separated by ODS open column and then by HPLC, resulting in the isolation of two inhibitors flazin and naringenin with IC_{50} = 7.2, 9.9 μM respectively, which were comparable to those of lycosides. We are now searching for additional asexual reproduction inhibitors.

【参考文献】

1）Iwai, R., Han, C., Govindam, S. V., & Ojika, M. *J. Agric. Food Chem.*, **66**, 163-169 (2017).

Phytophthora, asexual reproduction, phytochemical

発表責任者：安藤　優花（ando.yuka@j.mbox.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：2G03-04
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 10:00～ ミーティングルーム G

緑藻スジアオノリ（*Ulva prolifera*）由来エタノール抽出物のメラニン形成抑制効果
Suppression of melanin synthesis in ethanol extract derived from green alga *ulva prolifera*.
○萩原 志保[1]、中澤 昌美[1]、上田 光宏[1]、鈴木 大進[2]、堀田 敏弘[2]、川北 浩久[2]、橋爪 雄志[3]、タンジャ マハマド[3]、甲斐 建次[1]、阪本 龍司[1]（[1]大阪府大院生命環境、[2]高知県海洋深層水研究所、[3]東洋精糖（株））
○SHIHO HAGIHARA[1], MASAMI NAKAZAWA[1], MITSUHIRO UEDA[1], MASANOBU SUZUKI[2], TOSHIHIRO HOTTA[2], HIROYUKI KAWAKITA[2], YUSHI HASHIZUME[3], Mahamadou TANDIA[3], KENJI KAI[1], TATSUJI SAKAMOTO[1] ([1]Osaka Prefecture Univ., [2]Koti Prefectural Deepseawater Labo, [3]Toyo Sugar Refining Co., Ltd.)

海藻は地球上に約 25,000 種存在し、光合成色素組成の差異により褐藻類、紅藻類、緑藻類に分類される。多糖類や脂肪酸、テルペン類、ポリフェノール類など多様な生理活性物質を含み、これらの物質の多くは陸生植物では見られない独特の化学構造と特性を持っている。そのため、安心で環境に配慮した天然成分が注目されている化粧品業界において、海藻由来機能性成分は関心を集めている。本研究では、比較的報告の少ない緑藻類の中、人工培養法が確立されているスジアオノリ（*Ulva prolifera*）に着目し、メラニン形成抑制物質の探索と抑制メカニズムの解明を目指した。

海洋深層水および表層水で培養されたスジアオノリを原料として、エタノール抽出物（深層 UPE、表層 UPE）を獲得した。メラニン形成抑制効果は、マウスメラノーマ細胞株 B16F10 を用い、α-MSH により誘導されたメラニン形成の減少量によって評価した。深層および表層 UPE は、共に B16F10 細胞におけるメラニン形成を抑制したが、後者でより強力な抑制が認められた。そこで表層 UPE から、分液操作、シリカゲルカラム、ODS カラムに供することでメラニン形成抑制成分を単離した。現在、単離したメラニン形成抑制成分の構造解析および抑制経路の解明に取り組んでいる。

There are about 25,000 species of seaweed on the earth, and they are classified into brown, red, and green algae depending on the differences in photosynthetic pigments. Seaweeds contain a variety of bioactive substances such as polysaccharides, terpenes, and polyphenols, many of which have unique chemical structures and properties not found in terrestrial plants. Therefore, functional materials from seaweed have recently got attention in the cosmetics industry which requires safe and environmentally friendly natural substances. In this study, we focused on one of green algae, *Ulva prolifera*, and investigated the substances that suppress melanin synthesis contained in the extract.

Ethanol extracts (deep UPE and surface UPE) were obtained from *U. prolifera* cultivated in deep or surface sea water, respectively. We investigated the inhibitory effects of the UPEs on α-MSH-induced melanin synthesis in B16F10 cells. Both UPEs suppressed melanin synthesis in B16F10 cells, while the latter showed a stronger inhibitory effect. Therefore, the melanin synthesis inhibitory substance was isolated from the surface UPE by liquid separation, a silica gel column, and an ODS column. We now attempt to determine the structure of the isolated substance and elucidate the inhibitory mechanism.

seaweed, Ulva prolifera, melanin

発表責任者：阪本龍司（sakamoto@biochem.osakafu-u.ac.jp）

講演番号：2G03-05
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 10:00～ ミーティングルーム G

ナンキョウソウに含有される抗炎症作用成分

Anti-inflammatory activity of constituents isolated from *Alpinia galanga*

○坂本 裕介、二宮 清文、萬瀬 貴昭、村岡 修、森川 敏生（近畿大・薬総研）
○Yusuke SAKAMOTO, Kiyofumi NINOMIYA, Yoshiaki MANSE, Osamu MURAOKA, Toshio MORIKAWA (Kindai Univ.)

ショウガ科植物 *Alpinia galanga* は，東南アジアや中国などに分布する多年生草本で，タイでは Kha と称されている．本植物の果実および根茎は，香辛料あるいは薬味として食用に用いられている．また，伝統医学では，胃痛，消化不良，嘔吐，下痢，喘息，変形性関節症および関節リウマチの改善に用いられている．我々は，これまでに本植物果実抽出エキスにマウス由来 B16 メラノーマ 4A5 細胞を用いたテオフィリン誘発メラニン産生抑制活性を見いだしている．今回，リポ多糖刺激により誘発されるマクロファージの活性化抑制物質を探索すべく，マウス腹腔マクロファージを用いて，過剰に産生される NO を指標に活性を評価した．

実験は，ddY 系雄性マウスにチオグリコレート培地を腹腔内投与して，腹腔に滲出した細胞を回収して，実験に供した．96 穴培養プレートに播種した後，細胞を被験物質及び 10 μg/mL lipopolysaccharide (LPS) を添加した培地で 20 時間培養した. 培養上清中に蓄積した NO_2^- を NO として Griess 試薬を用いて定量した．

本植物果実抽出エキスについて，NO 産生抑制活性試験を実施したところ，比較的強い活性（IC_{50} = 29.9 μg/mL）を見いだした．エキスの活性を指標に含有成分も同様に評価したところ，1'*S*-1'-acetoxychavicol acetate や 1'*S*-1'-acetoxyeugenol acetate, galanganol D diacetate などを活性寄与成分として明らかにした．本講演では，構造活性相関についても紹介したい．

Alpinia galanga (Zingiberaceae) is a perennial herb found in Southeast Asia, China and locally known as “Kha” in Thailand. The fruits of *A. galanga* is used as an ingredient in traditional medicine, which is used to improve gastric pain, dyspepsia, vomiting, diarrhea, asthma, osteoarthritis and rheumatoid arthritis. We reported inhibitory effects of an extract from the fruits of *A. galanga* on Melanogenesis in B16 4A5 cells.

An extract from the fruits of *A. galanga* showed inhibitory effects on NO production in LPS-activated mouse peritoneal macrophages (IC_{50} = 29.9 μg/mL). Among the isolated constituents from the extract, 1'*S*-1'-acetoxychavicol acetate and 1'*S*-1'-acetoxyeugenol acetate, galanganol D diacetate and so on were found to inhibit NO production. We obtained knowledge about the relationship between the structure and activity of phenylpropanoids and 7-O-9'-linked neolignanes.

Alpinia galanga, NO, phenylpropanoid

講演番号：2G03-06
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 10:00～ ミーティングルーム G

Methanosarcina mazei 由来プレニル二リン酸特異的 Nudix hydrolase の機能解明

Elucidation of the function of prenyl diphosphate specific Nudix hydrolase from *Methanosarcina mazei*

○石橋 裕美、松嶋 夏海、吉村 徹、邊見 久（名大農）
○Yumi ISHIBASHI, Natsumi MATSUSHIMA, Tohru YOSHIMURA, Hisashi HEMMI (Nagoya Univ.)

Nudix (nucleoside diphosphates linked to some moiety x) hydrolase スーパーファミリータンパク質は、保存されたアミノ酸配列 $GX_5EX_7REVXEEXGU$ を含むピロホスホヒドロラーゼである。Nudix hydrolase は、典型的には、部位 X に連結されたヌクレオシド二リン酸の加水分解を触媒してヌクレオシド一リン酸と X-リン酸に変換するが、一部の Nudix hydrolase は、末端の二リン酸または三リン酸基を加水分解し、リン酸基に変換する。

メタン生成古細菌 *Methanosarcina mazei* 由来の Nudix hydrolase ファミリータンパク質の 1 つである MM_2582 は、タイプ I イソペンテニル二リン酸異性化酵素に相同性を示すが、その機能については不明であった。本研究では MM_2582 を大腸菌に発現させ、精製し、その機能を調べた。基質特異性を調べた結果、MM_2582 は短鎖プレニル二リン酸に対して高い加水分解活性を示したが、既知の Nudix hydrolase の好ましい基質であるヌクレオシド化合物に対してはほとんど加水分解活性を示さなかった。速度論解析の結果、同酵素はゲラニル二リン酸よりもジメチルアリル二リン酸をより良い基質とすることが示され、典型的にはジメチルアリルリン酸を基質として生合成される補酵素プレニル化 FMN の生合成におけるその役割が示唆された。

The Nudix (nucleoside diphosphates linked to some moiety x) hydrolase superfamily is a class of pyrophosphohydrolases characterized by containing the conserved amino acid sequence $GX_5EX_7REVXEEXGU$. Nudix hydrolases typically catalyze the hydrolyzation of nucleoside diphosphate linked to moiety X and yield nucleoside monophosphate and X-phosphate, while some of them hydrolyze a terminal di- or triphosphate group and convert it into a phosphate group.

A Nudix hydrolase family protein, MM_2582, from a methanogenic archaeon *Methanosarcina mazei* has sequence homology with type I isopentenyl diphosphate isomerase, but its function remains unclear. In this study, MM_2582 was recombinantly expressed in *Escherichia coli*, purified, and characterized. The recombinant protein showed high hydrolytic activity toward short-chain prenyl diphosphates, but not toward nucleosidic compounds that are preferable substrates for known Nudix hydrolases. Kinetic analysis demonstrated that the enzyme prefers dimethylallyl diphosphate to geranyl diphosphate, suggesting its role on the biosynthesis of prenylated FMN cofactor, which is a coenzyme typically biosynthesized from dimethylallyl phosphate.

Nudix hyrolase, prenyl diphosphate, archaea

講演番号：2G03-07
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 10:00～ ミーティングルーム G

輸送工学を利用した大腸菌における効率的なアルカロイド生産

Transport engineering to improve alkaloid production in *Escherichia coli*

○山田 泰之[1]、潤井 みや[1]、大木 秀浩[1]、井上 開[1]、佐藤 文彦[2,4]、南 博道[3]、士反 伸和[1] ([1]神戸薬大、[2]京大院生命、[3]石川県大、[4]阪府大院理)
○Yasuyuki YAMADA[1], Miya URUI[1], Hidehiro OKI[1], Kai INOUE[1], Fumihiko SATO[2,4], Hiromichi MINAMI[3], Nobukazu SHITAN[1] ([1]Kobe Pharma. Univ., [2]Kyoto Univ., [3]Ishikawa Pref. Univ., [4]Osaka Pref. Univ.)

近年、植物有用二次代謝産物の生合成経路を微生物において再構築させる生合成工学が急速に発展し、重要な医薬品原料の微生物生産が可能となってきている。一方、微生物生産においては、生産する化合物の生物活性（毒性）による生産効率の低下をいかに回避するかが課題の 1 つに挙げられる。本研究では、多様な活性を有するベンジルイソキノリンアルカロイド（BIA）の重要中間体 reticuline を生産する大腸菌[1,2]にアルカロイド輸送体を導入し、生産効率向上の検証を行った。

生体異物排出輸送体であるシロイヌナズナの AtDTX1 が、大腸菌において発現し、実際に reticuline を排出することを確認した後、reticuline 生産大腸菌へと導入して生産性への影響を解析した。その結果、菌体内および培地中の reticuline 生産量は、コントロール株に比べて 3～11 倍程度上昇し、生産効率の向上が認められた。生産効率向上のより詳細なメカニズム解明を目的に、RNA-seq 解析やプラスミド保持率の解析を行った結果、多くの遺伝子発現変動やプラスミド保持率の向上も認めたので、それらの結果も合わせて考察する。

Plants produce various specialized metabolites which are used as important pharmaceuticals, essential oils and flavorings. Recently, the biosynthesis pathway of several specialized metabolites has been elucidated and reconstructed in microorganisms for efficient production. This technology is called synthetic biology and some useful compounds are reported to be produced in microorganisms. In some cases, however, growth retardation and low productivity have been reported in microbial production, which is probably due to the cytotoxicity of products or negative feedback on the biosynthetic enzymes. In this study, we introduced an alkaloid transporter, AtDTX1, into engineered *Escherichia coli*[1,2] which can produce a key intermediate of benzylisoquinoline alkaloid, reticuline, and assessed the productivity.

Introduction of AtDTX1 in reticuline-producing *E. coli* highly improved reticuline production and led to the efflux of reticuline to the medium. The expression of AtDTX1 also affects the plasmid stability and gene expression profiles related to metabolite processes and others. We suggest that transport engineering is a powerful tool to enhance the productivity of plant valuable metabolites in microorganisms.

[1] Nakagawa et al., *Nat Commun.* 2011; 2:326.
[2] Matsumura et al., *Sci Rep.* 2018; 8:7980

transport engineering, alkaloid, microbial production

発表責任者：山田泰之（yyamada@kobepharma-u.ac.jp）

講演番号：2G03-08
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 10:00～ ミーティングルーム G

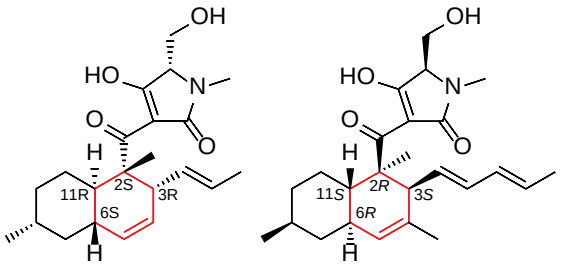
デカリン合成酵素 Phm7 および Fsa2 の in vitro アッセイ系の構築

Establishment of *in vitro* assay system for decalin synthases, Phm7 and Fsa2

○加藤 直樹[1,2]、藤山 敬介[3]、野川 俊彦[2]、長田 裕之[2]、永野 真吾[3]、高橋 俊二[2]([1]摂南大農、[2]理研 CSRS、[3]鳥取大院工)
○ Naoki KATO[1,2], Keisuke FUJIYAMA[3], Toshihiko NOGAWA[2], Hiroyuki OSADA[2], Shingo NAGANO[3], Shunji TAKAHASHI[2] ([1]Setsunan Univ., [2]RIKEN CSRS, [3]Tottori Univ.)

【目的】不斉点に富んだ複雑な構造は天然物の最たる特徴の 1 つであり、その立体化学は特異的かつ強力な生物活性と密接な関係がある。天然物の生合成経路において立体化学を制御する鍵酵素を同定し、そのメカニズムを理解することは、合理的な生合成経路拡張に不可欠である。私たちは、糸状菌の生産する抗ウイルス活性物質エキセチンおよびフォマセチンの生合成経路において、立体化学構築を司るデカリン合成酵素 Fsa2, Phm7 に着目し、解析してきた。両酵素は、直鎖状ポリエンから分子内[4+2]環化付加反応を介し、互いに鏡像異性の産物を生成するが、その触媒メカニズムの詳細は不明である。本発表では、メカニズム解明に向けて構築した *in vitro* 酵素アッセイ系について報告する。

【方法と結果】Phm7 の基質は分子内にテトラエン構造を有しており、化学合成での調製は困難が予想された。そこで、フォマセチン生産菌 *Pyrenochaetopsis* sp. RK10-F058 株に由来する *phm7* 欠失株の菌糸から細胞抽出液を調製し、基質溶液として用いることを検討した。細胞抽出液を LC/MS 分析に供したところ、環化物と同じ *m/z* を持ち、かつテトラエンに特徴的な UV スペクトラムを示すピークが検出された。



次にこの抽出液に大腸菌より調製した組換え Phm7 を添加することで、酵素活性の検出を試みた。反応産物を LC/MS 分析したところ、上述の予想基質ピークが減少し、代わりに酵素産物の生成が確認出来た。Phm7 の代わりに Fsa2 を添加することでエキセチン型デカリンを有する立体異性体が生成した。現在は酵素の構造解析に基づいた部位特異的変異実験を行うことで、その触媒メカニズムの解析に取り組んでいる。

We established *in vitro* assay system for decalin synthases, Phm7 and Fsa2, that catalyze enantioselective [4+2] cycloaddition. Cell lysates were prepared from the Δ*phm7* mutant derived from a phomasetin producer fungus, *Pyrenochaetopsis* sp. RK10-F058, and used as a substrate for enzyme assay. LC/MS analysis of reaction mixtures of recombinant Phm7 and Fsa2 with the cell lysates showed the decrease in predicted substrate and the formation of expected products.

[4+2] cycloaddition, decalin synthase, natural product biosynthesis

発表責任者：加藤　直樹（naoki.kato@setsunan.ac.jp）

講演番号：2G03-09
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 10:00～ ミーティングルーム G

生合成の *in vitro* 再構成系を利用した新規 trichostatin 類縁体の創生

In vitro enzymatic production of novel trichostatin analogs

○松田 悠太郎[1]、湯澤 賢[2]、青山 美和子[1]、大澤 宏祐[3]、吉田 将人[3]、土井 隆行[3]、新家 一男[4]、西山 真[5,6]、葛山 智久[1,6]([1]東大院・農生科、[2]慶大・先端生命研、[3]東北大院・薬、[4]産総研、[5]東大・生物工学セ、[6]東大・微生物連携機構)
○ Yutaro MATSUDA[1], Satoshi YUZAWA[2], Miwako AOYAMA[1], Kosuke OHSAWA[3], Masahito YOSHIDA[3], Takayuki DOI[3], Kazuo SHIN-YA[4], Makoto NISHIYAMA[5,6], Tomohisa KUZUYAMA[1,6] ([1]GSALS, UTokyo, [2]Inst. Adv. Biosci., Keio Univ., [3]Grad. Sch. Pharm. Sci., Tohoku Univ., [4]AIST, [5]BRC, UTokyo, [6]CRIIM, UTokyo)

【背景と目的】Trichostatin A (TSA) は放線菌によって生産される二次代謝産物の 1 つであり、その強いヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害活性によって、抗真菌作用を示す[1,2]。HDAC は転写制御に関与するため、抗がん剤としての利用が期待されていたが、末端に創薬忌避構造であるアニリン構造を有することから、現在、医薬品としては利用されていない。TSA 類縁体の創生はアニリン構造の除去や HDAC 選択性の付与など、TSA 骨格を利用した新しい抗がん剤の開発に向けて極めて重要な意味を持つ。本研究では、TSA 生合成を担う各酵素の精製により TSA 生合成系の *in vitro* 再構成を試み、基質や酵素の改変により様々な有用類縁体の創出に取り組んだ。
【結果】前回の本大会にて、TSA 前駆体である trichostatic acid 生合成の *in vitro* 再構成系を構築した[3,4]。この再構成系に TsnB9 (ヒドロキシアミド基転移酵素)、GluHx (ヒドロキサム酸基供与体) を加えて反応させたところ、TSA の生成が検出された。さらに、この系において、TSA のポリケチド骨格の開始基質である *p*-aminobenzoic acid (PABA) をその類縁体に置き換えて再び反応させたところ、各開始基質に対応する TSA の新規類縁体が合計 18 種確認された。

Background Trichostatin A (TSA) is a secondary metabolite produced by *Streptomyces* species and has a potent inhibitory activity for almost all classes of histone deacetylases (HDACs).[1,2] Although TSA is expected to be developed as an anti-tumor drug, it has yet to be approved as a drug most likely due to its aniline moiety. Here we report *in vitro* TSA analog production where the aniline moiety is replaced with other chemicals, which may selectively inhibit different classes of HDACs.
Results We previously reported trichostatic acid, a TSA precursor, production using 5 recombinant enzymes (TsnB1, TsnB2, TsnB3, TsnB8, and TsnB12) and necessary substrates (*p*-aminobenzoic acid (PABA), ATP, SAM, malonyl-CoA, methylmalonyl-CoA and NADPH) *in vitro*. In the present study, we have successfully produced TSA using the *in vitro* reconstituted system by adding TsnB9 and a glutamine analog, GluHx. Furthermore, by simply replacing the starter substrate, PABA, with other acids, we detected 18 new TSA analogs.

[1] Tsuji N. *et al. J. Antibiot.* **29**, 1 (1976), [2] Yoshida M. *et al. J. Biol. Chem.* **265**, 17174 (1990),
[3] Kudo K. *et al. J. Am. Chem. Soc.* **139** 6799 (2017),
[4] Aoyama M. *et al. JSBBA Annual Meeting* **3B05p01** (2020)

HDAC inhibitor, hydroxamate, natural product

講演番号：2G03-10
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 10:00～ ミーティングルーム G

放線菌が生産するアゾキシアルケン化合物の生合成機構の解析

Investigation of biosynthetic pathway of azoxyalkene compounds produced by *Streptomyces*

○田中 悠[1]、達川 綾香[2]、藤田 昂大[1]、岸本 拓也[2]、福本 敦[3]、安齊 洋次郎[3]、荒川 賢治[1,2] ([1]広島大院・統合生命、[2]広島大院・先端研、[3]東邦大・薬)
○ Yu TANAKA[1], Ayaka TATSUKAWA[2], Kota FUJITA[1], Takuya KISHIMOTO[2], Atsushi FUKUMOTO[3], Yojiro ANZAI[3], Kenji ARAKAWA[1,2] ([1]Grad. Sch. Integr. Sci. Life, Hiroshima Univ., [2]Grad. Sch. AdSM, Hiroshima Univ., [3]Toho Univ.)

【目的】放線菌は抗生物質を含めた多種多様な二次代謝産物を生産し、ゲノム上には約 30 種類もの二次代謝生合成遺伝子群を有しているが、通常培養では 2 割程度しか生産しない。当研究室では *Streptomyces rochei* の休眠二次代謝の覚醒を目指し、主要二次代謝産物であるランカサイジン(LC)、ランカマイシン(LM)の生合成遺伝子および転写リプレッサー*srrB* に変異を加えた三重破壊株 KA57 を構築したところ、親株非生産のアゾキシアルケン化合物 KA57-A が得られた。本化合物のアゾキシ結合形成メカニズムは興味深く、さらに *Chromobacterium violaceum* の quorum sensing を阻害することも明らかとなっている。そこで、KA57-A のアゾキシ結合生合成メカニズムの解明および生理活性の向上を指向した構造リデザインを目指した。
【方法・結果】KA57-A 生合成遺伝子クラスター(azx)と他のアゾキシアルケン化合物 valanimycin(vlm)および maniwamycin(mwm)の生合成遺伝子クラスターを比較したところ、共通の遺伝子群を見いだすことができた。そこで、アゾキシ結合形成への関与が示唆される遺伝子の破壊株を構築し、代謝産物解析を行なったところ、キナーゼ、*vlmB* ホモログを含む 4 つの遺伝子の破壊株において KA57-A 生産が認められず、これら遺伝子の KA57-A 生産への関与が示唆された。現在、*vlmB* ホモログ破壊株の代謝産物解析を行っており中間体の取得を試みると同時に、生合成への関与が示唆される他の遺伝子についても破壊株の構築を行っている。また、生合成起源のより詳細な解析および生物活性試験を行っており、本発表ではその経緯についても報告する。

Streptomyces genome harbors over 30 secondary metabolites biosynthetic gene clusters, but most of them are not characterized. We obtained azoxyalkene compound KA57-A from mutant KA57 that carries triple mutations on a repressor gene and two major secondary metabolites genes. This compound contains azoxy bond and inhibits a quorum sensing in *Chromobacterium violaceum*.
We identified a gene cluster for KA57-A biosynthesis by comparative analysis of gene cluster of other azoxyalkenes including valanimycin and maniwamycin, and found four essential genes for biosynthesis of KA57-A. In addition, biosynthetic origin of azoxyalkenes, metabolites analysis of the biosynthetic mutants together with their biological activity will be described in this paper.

Streptomyces, azoxyalkene, biosynthesis

発表責任者：荒川賢治（karakawa@hiroshima-u.ac.jp）

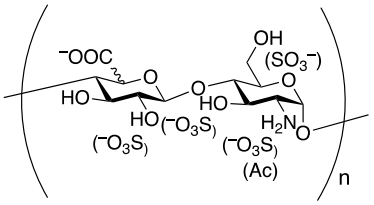
講演番号：2G03-11
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 10:00～ ミーティングルーム G

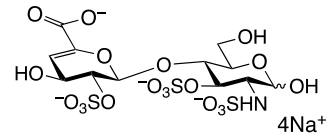
3-*O*-ヘパラン硫酸モデル分子の合成研究

Synthetic study on the analogue of 3-*O*-heparan sulfate

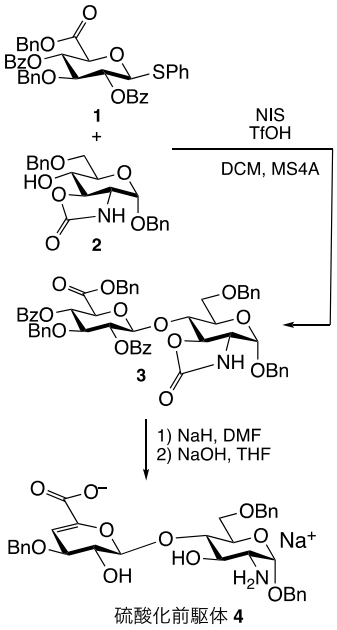
○西本 茉由、伊藤 優樹、村上 慧、山田 英俊、若森 晋之介（関西学院大理工）
○May NISHIMOTO, Yuki Ito, Kei MURAKAMI, Hidetoshi YAMADA, Shinnosuke WAKAMORI (Kwansei Gakuin Univ.)

3-*O*-硫酸化ヘパラン硫酸（3-*O*-硫酸化 HS）は，D-グルクロン酸部（GlcA）と 3 位酸素が硫酸化された D-グルコサミン部（GlcN）が 1,4-結合した二糖単位の繰り返しからなる直鎖硫酸化多糖である。近年 3-*O*-硫酸化 HS に関して，アルツハイマー病発症の原因であるタウタンパク質の過剰リン酸化への関与が明らかとなったため，3-*O*-硫酸化 HS のリン酸化機能の詳細解明が望まれている。本研究では HS の最小単位となる二糖部分をモデル分子（TriS）として設計し，その化学合成を検討した。





今回私たちは，TriS の硫酸化前駆体の合成経路を確立した。既知の GlcA 誘導体から合成した糖供与体 **1** と GlcN 誘導体から合成した糖受容体 **2** のグリコシル化反応を検討した。活性化剤として NIS と TfOH を用いると目的の **3** を与えた。得られた **3** を水素化ナトリウムで処理することでウロン酸部位を形成後，水酸化ナトリウムでアシル系保護基を除去し，硫酸化前駆体 **4** を合成した。一方で，グリコシル化反応では **3** の収率が 0%～67%であり再現が得られなかった。そのため現在は，グリコシル化反応の最適条件を検討している。



3-*O*-sulfated heparan sulfate (3-*O*-sulfated HS) is a linear sulfated polysaccharide consists of a repeating 1,4-linked disaccharide unit of D-glucuronic acid moiety (GlcA) and D-glucosamine moiety (GlcN) sulfated on 3-oxygen position. In recently published reports, 3-*O*-sulfated HS involves in the over-phosphorylation of tau protein, which causes Alzheimer's disease. Our research group designed TriS as an analogue of 3-*O*-sulfated HS.

In this study, we developed a synthetic pathway for the precursor of TriS. The glycosylation of **1** and **2** using NIS/TfOH as an activator provided the desired **3**. Treatment of **3** with sodium hydride followed by sodium hydroxide constructed the uronic acid moiety to afford **4**. In contrast, since the glycosylation was not replicable, the further study investigated the glycosylation conditions.

Organic chemistry, Heparan sulphate, Glycosylation

発表責任者：若森　晋之介（shinnosuke1010@kwansei.ac.jp）

講演番号：2G03-12
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 10:00～ ミーティングルーム G

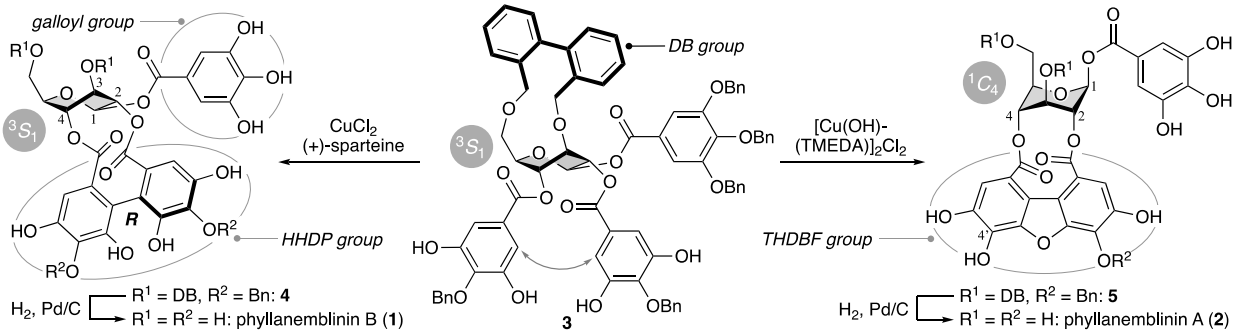
糖の柔軟化を基盤としたポリフェノールの合成研究

Synthetic study of polyphenols based on suppleness in sugars

○松本 慎太郎、村上 慧、山田 英俊、若森 晋之介（関西学院大理工）
○ Shintaro MATSUMOTO, Kei MURAKAMI, Hidetoshi YAMADA, Shinnosuke WAKAMORI (Kwansei Gakuin Univ.)

エラジタンニンである phyllanemblinin B（**1**）は，グルコースの 2,4 位酸素に軸不斉が *R* のヘキサヒドロキシジフェノイル（HHDP）基を有している。その類縁体である phyllanemblinin A（**2**）は，HHDP 基の代わりにテトラヒドロキシジベンゾフラノイル（THDBF）基を持つ。架橋基の種類によって糖の立体配座が異なることが **1** と **2** の特徴であり，それぞれ $^3S_1$ と $^1C_4$ 配座である。

今回私たちは，「糖の柔軟化」の概念を基軸とした **1** と **2** の初の全合成を達成した。すなわち，糖の 3,6 位酸素にジベンジル（DB）基を採用することで $^3S_1$ 配座となった **3** に対して，$CuCl_2$–(+)-sparteine 錯体を作用させると(*R*)-HHDP 基を有する **4** が形成され，続く加水素分解によって **1** が得られた。一方で $[Cu(OH)(TMEDA)]_2Cl_2$ は，**3** から 4’位のベンジル基が除去された THDBF 基を有する **5** を与え，その後全ての保護基を取り除くことで **2** を全合成した。



Phyllanemblinin B (**1**), a natural ellagitannin, contains a (*R*)-hexahydroxydiphenoyl (HHDP) group bridging between O-2 and O-4 of the D-glucose. Phyllanemblinin A (**2**) is also reported for the analogue possessing a tetrahydroxydibenzofuranoyl (THDBF) group instead of the HHDP group. For a unique feature of **1** and **2**, the type of the biaryl components differently shapes their glucopyranose moieties, as $^3S_1$ and $^1C_4$ conformations, respectively.

In this study, we achieved the first total synthesis of **1** and **2** based on the concept "suppleness in sugars." The adoption of the dibenzyl (DB) group bridging between O-3 and O-6 of **3** held the pyranose as $^3S_1$ conformation. The oxidation of **3** using copper(II) chloride and (+)-sparteine constructed the (*R*)-HHDP group to afford **4**. In contrast, treatment of **3** with $[Cu(OH)(TMEDA)]_2Cl_2$ unexpectedly formed the THDBF group to provide **5**. Hydrogenolysis of the benzyl and DB groups of **4** presented **1**, and the same process converted **5** into **2**.

organic synthesis, polyphenol, suppleness in sugars

発表責任者：若森晋之介（shinnosuke1010@kwansei.ac.jp）

講演番号：2G03-13
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 10:00～ ミーティングルーム G

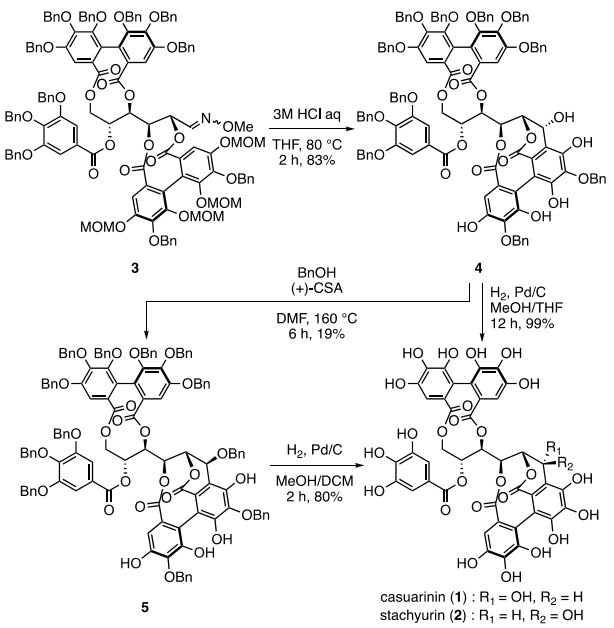
ポリフェノールの一種である *C*-グリコシドエラジタンニンの合成研究

Synthetic study of *C*-glycosidic ellagitannins as a class of polyphenols

○楠木 怜奈[1]、藤本 和宏[2]、柳井 毅[2]、村上 慧[1]、山田 英俊[1]、若森 晋之介[1]（[1]関西学院大理工、[2]名大 ITbM）

○ Reina KUSUKI[1], Kazuhiro FUJIMOTO[2], Takeshi YANAI[2], Kei MURAKAMI[1], Hidetoshi YAMADA[1], Shinnosuke WAKAMORI[1] ([1]Kwansei Gakuin Univ., [2]Nagoya Univ.)

Casuarinin（**1**）およびその 1 位ヒドロキシ基の異性体の stachyurin（**2**）は, ブナ科やクルミ科から単離された *C*-グリコシドエラジタンニンである。その生物活性は, 抗酸化作用や収れん作用など多岐にわたる。これらは鎖状グルコースの 2,3 位酸素上と 4,6 位酸素上に 2 つのヘキサヒドロキシジフェノイル（HHDP）基を有しており，2,3-*O*-HHDP 基は 1 位炭素と *C*-グリコシド結合している。これまでに，オキシムを用いた立体選択的な *C*-グリコシル化反応を開発し casuarinin（**1**）の全合成を達成している。



今回私たちは，*C*-グリコシル化の反応機構を検証し，casuarinin 類縁体を合成した。DFT 計算の結果，**3** を用いた *C*-グリコシル化反応は熱力学的支配で進行していることが示唆された。また，**4** に BnOH と(+)-CSA を作用させて，1 位に β-OBn を導入し，stachyurin 前駆体 **5** とした。その後，加水素分解にてすべての Bn 基を除去し，stachyurin（**2**）を全合成した。

Casuarinin (**1**) and its 1-OH epimer, stachyurin (**2**), are *C*-glycosidic ellagitannins isolated from Fagaceae and Juglandaceae families. Their biological activities are diverse, including antioxidant and astringent effects. These compounds consist of two hexahydroxydiphenoyl (HHDP) groups on the 2,3- and 4,6-oxygen positions of the open-chain type glucose, which the 2,3-*O*-HHDP group links to C-1 through a *C*-glycosidic bond. Previously, our study developed a stereoselective *C*-glycosylation reaction using an oxime and achieved the total synthesis of casuarinin (**1**).

In this study, we examined the reaction mechanism of *C*-glycosylation and synthesized a casuarinin analogue. DFT calculations suggested that the *C*-glycosylation reaction of **3** proceeds under thermodynamic control. Treatment of **4** with BnOH and (+)-CSA provided stachyurin precursor **5**. Subsequently, hydrogenolysis of **5** removed all Bn groups to afford stachyurin (**2**).

Organic synthesis, ellagitannin, *C*-glycosidic bond

発表責任者：若森晋之介（shinnosuke1010@kwansei.ac.jp）

講演番号：2G03-14
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 10:00～ ミーティングルーム G

N-ヒドロキシフタルイミド類縁体によるアルデヒドの酸化反応の調査

Investigation of aldehyde oxidation reaction by *N*-Hydroxyphthalimide analogs

○髙松 啓吾、西澤 永愛、笠井 美郁、鈴木 莉緒、今野 博行（山形大院理工）
○Keigo TAKAMATSU, Hinaru NISHIZAWA, Miku KASAI, Rio SUZUKI, Hiroyuki KONNO (Yamagata Univ.)

N-ヒドロキシフタルイミド （NHPI）は無臭の白色固体で、*N*-オキシラジカル中間体となって様々な官能基を穏やかな条件下で酸化することが報告されている。そのため、近年 NHPI を用いた酸化反応に関する論文が多数報告されており、新たな酸化剤として注目を集めている。
2019 年に Dai らは NHPI を用いた温和な条件下でのアルデヒドからカルボン酸への酸化反応を報告した[1)] 。そこで我々は酸化効率向上を目指し NHPI に対する構造活性相関ならびに反応条件の最適化を行った。その結果、ナフタレン骨格を有する *N*-ヒドロキシ活性体が最も反応効率が高いことを突き止め、CH_3CN 中で行った際に最も反応が進行することを見出した。そこでこの最適条件下でアルデヒドの酸化を検討したところ、カルボン酸と過酸が混合物で得られた。これらは水による後処理によってカルボン酸のみを得ることができる。また、基質の適用範囲を調査した結果、脂肪族アルデヒドやベンズアルデヒド類では高い変換効率を示した(Fig.1)。現在、適用範囲の限界を見極めており、併せて報告する。

N-Hydroxyphthalimide (NHPI) is an odorless white solid that has been reported to become an *N*-oxyradical intermediate and oxidizes various functional groups under mild conditions. Recently, there are many reports of the oxidation reaction using NHPI and it is attracting attention as a new oxidizing agent.
Following this oxidation reaction of aldehyde under mild conditions using NHPI[1)], we examined the oxidation by the NHPI and related compounds. In this case, the mixture of carboxylic acids and peracids were obtained. Furthermore, we optimized the reaction conditions and applied to a variety of substrates. As a result, aliphatic aldehydes and benzaldehyde derivatives showed high conversion efficiently.

1) Dai, P.F.; Qu, J.P.; Kang, Y.B. *Org. Lett.* **2019**, *21*, 1393-1396

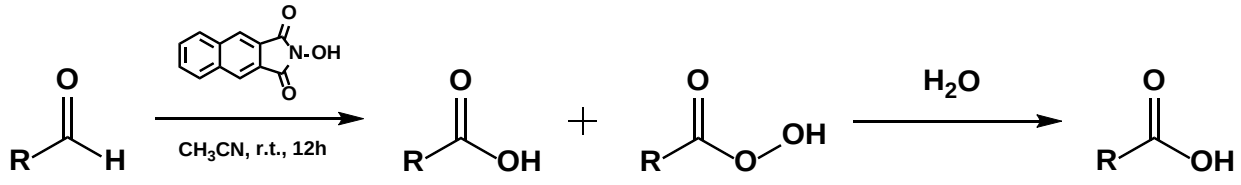


Fig.1 Oxidation reaction of aldehyde by using NHPI analog

N-Hydroxyphtalimide, Aldehyde oxdation reaction

発表責任者：高松啓吾（twa56155@st.yamagata-u.ac.jp）

講演番号：2G03-15
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 10:00～ ミーティングルーム G

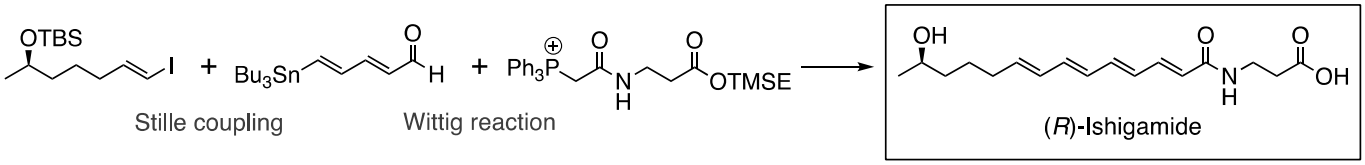
高還元型ポリケチドである ishigamide の合成と立体化学の決定

Synthesis and stereochemical determination of the highly reduced polyketide ishigamide

○石神 健[1]、瀬尾 みつき[1]、ト タンヤオ[2]、勝山 陽平[2,3]、勝田 亮[1]、矢島 新[1]、額田 恭郎[1]、大西 康夫[2,3] ([1]東農大・生命、[2]東大院・農生科・応生工、[3]東大・微生物イノベ連携機構)
○Ken ISHIGAMI[1], Mitsuki SEO[1], Danyao DU[2], Yohei KATSUYAMA[2,3], Ryo KATSUTA[1], Arata YAJIMA[1], Tomoo NUKADA[1], Yasuo OHNISHI[2,3] ([1]Dept. of Chem. for Life Sci. and Agric., Tokyo Univ. of Agric., [2]Grad. Sch. of Agric. and Life Sci., Univ. of Tokyo, [3]CRIIM, Univ. of Tokyo)

放線菌が生産する ishigamide は還元度の高いテトラエンカルボン酸部分を有するが、このポリエン鎖は II 型ポリケチド合成酵素（II 型 PKS）により生合成されていることが判明しており、「高還元型 II 型 PKS」という新しいサブファミリーが提唱されている(1)。

本化合物の絶対立体配置は生産量が少なく不明であったが、その決定を目的に合成研究を行った。光学活性なヨウ化ビニル、スタニルジエナール、リンイリドの三成分を Stille カップリングと Wittig 反応により順次連結し、ishigamide の光学活性体合成に成功した。合成品と天然物のキラル HPLC 分析により、天然物の絶対立体配置が *R* であると決定することができた(2)。



Ishigamide was isolated as a metabolite of *Streptomyces* sp. and its unsaturated fatty acid moiety has been confirmed to be synthesized by a type II PKS.(1) Absolute configuration of ishigamide remained to be elucidated because of its low productivity. We aimed for enantioselective synthesis in order to determine the absolute configuration of natural ishigamide. (*R*)-Ishigamide was synthesized enantioselectively employing Stille coupling and Wittig reaction between three units, vinyl iodide, stannyldienal, and Wittig salt. Stereochemistry of natural ishigamide was determined to be *R* by chiral HPLC analysis comparing with the synthesized standard.(2)

(1) Du, D.; Katsuyama, Y.; Horiuchi, M.; Fushinobu, S.; Chen, A.; Davis, T. D.; Burkart, M. D.; Ohnishi, Y. *Nat. Chem. Biol.*, **16**, 776-782 (2020).
(2) Seo, M.; Du, D.; Katsuyama, Y.; Katsuta, R.; Yajima, A.; Nukada, T.; Ohnishi, Y.; Ishigami. K. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **85**, in press (2021).

ishigamide, determination of absolute configuration, polyketide

発表責任者：石神　健（ki206171@nodai.ac.jp）

講演番号：2G05-01
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 11:00～ ミーティングルーム G

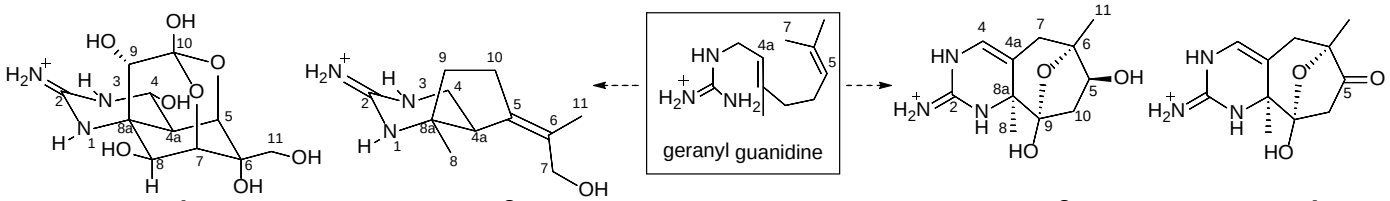
アメリカ産テトロドトキシン含有イモリより得られた新規環状グアニジノ化合物

New cyclic guanidino compounds from the American tetrodotoxin-bearing newts

○工藤 雄大[1,2]、ハニフィン チャールス[3]、山下 まり[2]([1]東北大学際研、[2]東北大院農、[3]ユタ州立大生物)

○Yuta Kudo[1,2], Charles Hanifin[3], Mari Yotsu-Yamashita[2] ([1]Tohoku Univ. FRIS, [2]Tohoku Univ. Agr., [3]USU Uintah-Basin Biol.)

両生類は多様な化学防御物質を保有し、中でも神経毒テトロドトキシン (tetrodotoxin, TTX (**1**))を有するヤドクガエルやイモリが種々知られている。これら両生類は TTX を自身で生産せず、外部から毒を取り込んでいると考えられるが [1]、生産者が明確には定まっていない。TTX がどの様に生合成されるかは未だ不明であり、これは海洋の TTX についても同様である。我々はこれまで TTX 含有生物の精密な LCMS 解析から、TTX の推定生合成関連化合物 (**2** など) を発見し、生合成経路を考察してきた [2–4]。本研究では、前年度の発表に引き続きアメリカ産のサメハダイモリ (*Taricha granulosa*) から新たな TTX 関連化合物を MS で探索した。探索の結果、2 つの新規化合物 (**3**, **4**) が検出され、精製後に NMR で構造を解析した。いずれもモノテルペン geranyl guanidine に由来すると推測される環状グアニジノ化合物と判明した [5]。これまで同定してきた TTX 類縁体と環状グアニジノ化合物と併せて、これら化合物の構造から、陸上における TTX および環状グアニジノ化合物の生合成経路を考察した。



TTX (**1**)　Cep-210 (**2**)　Tgr-240 (**3**)　Tgr-238 (**4**)

Some newts and frogs employ the potent neurotoxin, tetrodotoxin (TTX (**1**)), as chemical defense. These amphibians were believed to accumulate TTX from the external source,[1] but the producer of TTX was not conclusively determined. The biosynthesis of TTX remains unresolved in both marine and terrestrial environments. We have been identified a number of natural TTX-related compounds including **2** from toxic animals to propose its biosynthetic pathway.[2–4] In this study, we found new cyclic guanidino compounds (**3**, **4**), and discussed the biosynthetic and shunt pathways of TTX in terrestrial organisms based on these structures.[5]

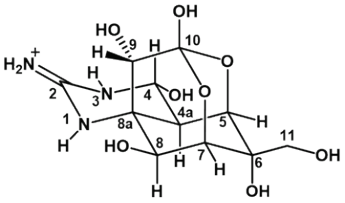
[Ref.] (1) Kudo, Y.; Chiba, C.; Konoki, K.; Cho, Y.; Yotsu-Yamashita, M. *Toxicon* **2017**, *137*, 78–82. (2) Kudo, Y.; Yasumoto, T.; Mebs, D.; Cho, Y.; Konoki, K.; Yotsu-Yamashita, M. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2016**, *55*, 8728–8731. (3) Kudo, Y.; Yotsu-Yamashita, M. *J. Nat. Prod.* **2019**, *82*, 1656–1663. (4) Ueyama, N.; Sugimoto, K.; Kudo, Y.; Onodera, K. I.; Cho, Y.; Konoki, K.; Nishikawa, T.; Yotsu-Yamashita, M. *Chem. - A Eur. J.* **2018**, *24*, 7250–7258. (5) Kudo, Y.; Hanifin, C. T.; Kotaki, Y.; Yotsu-Yamashita, M. *J. Nat. Prod.* **2020**, *83*, 2706–2717.

Tetrodotoxin, structural elucidation, biosynthesis

発表責任者：山下まり（mari.yamashita.c1@tohoku.ac.jp）

講演番号：2G05-02
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 11:00～ ミーティングルーム G

フグ由来の新規テトロドトキシン関連化合物
The novel tetrodotoxin related compounds from pufferfish
○八重樫 優士[1]、上山 望[1]、工藤 雄大[1,2]、長 由扶子[1]、此木 敬一[1]、山下 まり[1] ([1]東北大院農、[2]東北大学際研)
○ Yuji Yaegashi[1], Nozomi Ueyama[1], Yuta Kudo[1,2], Yuko Cho[1], Keiichi Konoki[1], Mari Yotsu-Yamashita[1] ([1]Tohoku Univ. Agr., [2]Tohoku Univ. FRIS)


TTX (**1**)

【背景・目的】テトロドトキシン (**1**) は電位依存性ナトリウムチャネル (Na_v) を強力に阻害する神経毒である。TTX はフグなどの海洋生物やイモリなどの両生類に広く含まれる。我々はこれまでに、ハチノジフグよりグアニジノ基を有する新規二環性スピロ化合物群を単離し、それらの構造から、海洋環境下での TTX の生合成経路を提唱した[1)]。本研究では、海洋生物における TTX 生合成経路の解明を目的とし、フグよりさらなる TTX 関連化合物を探索し、単離・構造決定を昨年度より継続して行った。
【方法】フグの皮からメタノール抽出物を得て、逆相カラムクロマトグラフィーで粗精製した後、溶出液を高分解能(HR)-LC-MS/MS で精査した。新規 TTX 関連化合物と推測される化合物 **2** を検出し、逆相 HPLC で単離した。また、別種のフグ卵巣を希酢酸で加熱抽出し、抽出物を活性炭処理後 HR-LC-MS/MS によって精査し、新規 TTX 類縁体と推測される化合物 **3** を検出した。化合物 **3** は弱酸性陽イオン交換樹脂と HILIC カラムで精製した。本年度は化合物の量を確保するため、さらに同様の方法で精製した。化合物 **2**,**3** をそれぞれ HR-ESI-MS と各種 NMR スペクトル測定に供して構造を推定した。
【結果・考察】化合物 **2**, **3** の分子式は HR-ESI-MS のデータからそれぞれ $C_{11}H_{20}N_3O_3$, $C_{11}H_{17}N_3O_8$ であることを再度確認した。化合物 **2** は各種 NMR スペクトルの解析から、これまで報告したグアニジノ基を有する二環性スピロ化合物群[1)]に類似する構造をもつと推定された。一方、化合物 **3** は各種 NMR スペクトルの解析から、互いに関連した化学構造をもつ２つの新規 TTX 類縁体の混合物であることが示された (**3a**, **3b**)。さらに、これらの化合物の海洋生物の TTX 推定生合成経路[1)]における位置付けを考察した。

Tetrodotoxin (TTX (**1**)) is a potent neurotoxin that blocks voltage-gated sodium ion channels (Na_v). In this study, we conducted further screening for novel TTX-related compounds in several species of pufferfish, and resulted in finding three compounds. Compound (**2**) was purified from the extract of the skin of the pufferfish, *Tetraodon biocellatus*. The other compounds (**3a**, **3b**) were purified from the extract of the ovary of other pufferfish. These compounds were applied to HR-ESI-MS and 2D NMR analysis to elucidate their structures.

【Reference】1) Ueyama, N., Sugimoto, K., Kudo, Y., Onodera, K., Cho, Y., Konoki, K., Nishikawa, T., Yotsu-Yamashita, M., *Chem. Eur. J.* **2018**, *24*, 7250–7258.

tetrodotoxin, structure elucidation, biosynthesis

発表責任者：山下 まり（mari.yamashita.c1@tohoku.ac.jp）

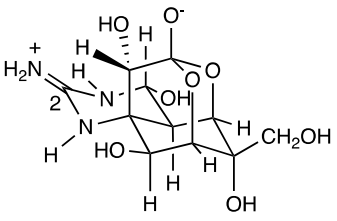
講演番号：2G05-03
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 11:00～ ミーティングルーム G

テトロドトキシン-タンパク質複合体作製のモデル反応と主生成物の構造決定

A model reaction for preparation of tetrodotoxin-protein conjugates, and elucidation of the structure of the major product

○善 瑞穂[1]、工藤 雄大[1,2]、長 由扶子[1]、此木 敬一[1]、山下 まり[1]（[1]東北大院農、[2]東北大学際研）
○Mizuho Zen[1], Yuta Kudo[1,2], Yuko Cho[1], Keiichi Konoki[1], Mari Yotsu-Yamashita[1] ([1]Tohoku Univ. Agr., [2]Tohoku Univ. FRIS)

【背景・目的】テトロドトキシン (TTX, **1**) は、フグ毒として知られる神経毒で、致死性の食中毒を引き起こす。フグ中毒時の解毒剤としての利用や、TTX の簡易定量法の確立を目指して、これまでに TTX に高い親和性を示すモノクローナル抗体や[1]、TTX を迅速にスクリーニングするための磁気ビーズ免疫検知ツールなどが開発されてきた[2]。これらの報告では、抗原の TTX-タンパク質複合体を作製する際に、TTX をホルムアルデヒドで担体タンパク質に結合させている。既報の論文から[2]、この反応でホルムアルデヒドは、TTX のグアニジノ基の 2 位のイミノ基窒素とタンパク質のリジンの側鎖アミノ基を架橋していると考えられた。しかし、この反応でどのような生成物ができているのか、詳細な化学的データの報告はない。本研究では、この反応のモデル反応を行い、生成物を同定することを目的とした。


TTX (**1**)

【方法】モデル反応として、タンパク質のリジン残基の代わりにエチルアミンを用い、TTX、ホルムアルデヒド、エチルアミンによるマンニッヒ類似反応を行った。その生成物を高分解能(HR)LC-MS で追跡し、カラム等で分画後、HR-MS や NMR を用いて主生成物の構造解析を行った。

【結果】反応後、TTX はほぼ消失し、複数の生成物が得られ、各生成物の分子量と分子式を特定した。分取後に、主生成物を酸性条件で NMR 測定すると、徐々に TTX に戻った。しかし、D_2O 中では比較的安定であり、各種 NMR スペクトルを測定し、構造を推定した。

Tetrodotoxin (TTX, **1**) is a highly potent neurotoxin which is known as the pufferfish toxin. Anti-TTX antibodies have been reported[1] and some application tools using these antibodies for easy detection of TTX have been developed[2]. However, the structures of the reaction products of TTX with formaldehyde and protein for preparation of antigen have not been well studied.

In this study, a model reaction for preparation of TTX-protein conjugate was performed, and the structure of the major product was elucidated using HR-MS and NMR spectroscopy.

【References】

1) Kawatsu, K. et al., *Jpn. J. Med. Sci. Biol.*, **1997**, *50*, 133 − 150.
2) Leonardo, S. et al., *Food Chem.*, **2019**, *290*, 255 − 262.

tetrodotoxin, antibody, structure elucidation

発表責任者：山下まり（mari.yamashita.c1@tohoku.ac.jp）

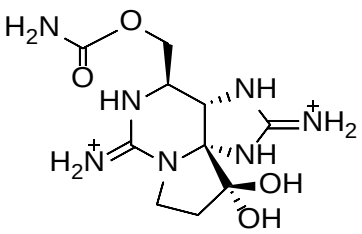
講演番号：2G05-04
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 11:00～ ミーティングルーム G

ホタテガイ（*Patinopecten yessoensis*）中における麻痺性貝毒代謝物の探索

Screening for metabolites of paralytic shellfish toxins in the scallop, *Patinopecten yessoensis*.

○沼野 聡[1,2]、工藤 雄大[1,3]、長 由扶子[1]、此木 敬一[1]、山下 まり[1]（[1]東北大院農、[2]岩手県環境保健研究センター、[3]東北大学際研）
○Satoshi Numano[1,2], Yuta Kudo[1,3], Yuko Cho[1], Keiichi Konoki[1], Mari Yotsu-Yamashita[1] ([1]Tohoku Univ. Agr., [2]Iwate, I-RIEP, [3]Tohoku Univ. FRIS)

【背景】麻痺性貝毒 (paralytic shellfish toxins, PSTs) は、電位依存性ナトリウムチャネルを特異的に阻害する強力な神経毒である。サキシトキシン (STX, **1**) を代表として、ゴニオトキシン (GTX) 類や C トキシン類など約 60 種類の類縁体が PSTs として知られている。近年、海外の貝類より、PSTs の主要毒に加えて、代謝物とされる M トキシン類の検出が報告されている [1)]。本研究では、国内で養殖されたホタテガイ, *Patinopecten yessoensis* 中の M トキシン類を探索し、単離・同定した。



Saxitoxin (**1**)

【方法】PSTs 生産渦鞭毛藻 (*Alexandrium* 属) が発生する海域で養殖されたホタテガイより、中腸腺のみを切り出し、希塩酸中で加熱抽出した。LC-MS で M トキシン類を追跡しながら、活性炭や陽イオン交換樹脂、HILILC カラムで精製した。単離した化合物群は、高分解能 (HR)-LC-MS/MS と各種 NMR スペクトル測定に供し、既報のデータ [1)]と比較して構造を確認した。また、単離した化合物を渡邊らの方法 [2)] により *N*-SO_3H を加水分解し、他の M トキシンへと変換した。

【結果・考察】単離した化合物は、HR-LC-MS/MS や NMR の解析結果から、C トキシンの代謝物として報告されている M1 および M3 であった。また、M1 から M2、M3 から M4 をそれぞれ化学誘導し、ホタテガイの抽出液と比較することで、国内の貝類も M1～M4 を含有することを確認した。一方で、海外の貝類において M5～M10 の検出が報告 [3)] されていることから、今後さらに国内の貝類で、M トキシン類の探索や構造確認が必要と考えられた。

Paralytic shellfish toxins (PSTs) are specific voltage-gated sodium channel (Na_v) blockers. Saxitoxin (STX, **1**) and its approximately 60 natural analogues are known as PSTs. Among them, the presence of M toxins (metabolite of PSTs) in foreign bivalves was recently reported[1)]. In this study, we conducted screening for M toxins in the digestive gland of the Japanese scallop using LC-MS and found the peaks possibly corresponding to M toxins. These compounds were purified and then analyzed using high resolution (HR)-LC-MS/MS and NMR. As a result, these compounds were identified as known M toxins, M1 and M3[1)]. With the standard prepared via chemical derivatization[2)] from M1 and M3, the presence of M2 and M4 in scallops was also confirmed using LC-MS.

【References】1) Dell'Aversano, *C. et al., J. Nat. Prod.,* **2012**, 71, 1518−1523. 2) Watanabe, R. *et al*., *Mar. Drugs*, **2011**, 9, 466−477. 3) Li. A., *et al*., *Food Addit. Contam*., **2012**, 29, 1455−1464.

paralytic shellfish toxin, saxitoxin, metabolite

発表責任者：山下 まり（mari.yamashita.c1@tohoku.ac.jp）

講演番号：2G05-05
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 11:00～ ミーティングルーム G

Bacillus amyloliquefaciens のランチペプチド生合成遺伝子の発現実験
Expression experiment of lanthipeptide biosynthetic genes of *Bacillus amylolique faciens*
○黒川 紗緒里、小谷 真也（静大院農）
○Saori KUROKAWA, shinya kodani (Shizuoka Univ. Grad. Sch. Agr.)

バクテリアの二次代謝産物の中に、リボソーム翻訳系翻訳後修飾生合成ペプチド（RiPPs）がある。RiPPs の中に、ランチペプチドという lanthionine 等の異常アミノ酸を含むペプチドがある。土壌に生息する放線菌は、気菌糸形成を経て胞子を作る複雑な生活環を有する。放線菌 *Streptomyces coelicolor* から発見されたランチペプチド SapB は気菌糸形成を誘導するホルモン様物質である（Kodani *et al.* PNAS 2004)。最近の我々のゲノムマイニングにより、*Bacillus* 属の細菌にも SapB の生合成遺伝子に類似した遺伝子が複数見出されている。そこで、*Bacillus amyloliquefaciens* のゲノムに存在する遺伝子クラスターの大腸菌を用いた発現実験を行った。その結果、ポジティブイオモード ESI-MS において、*m/z* $[M+H]^+$ 1319.6 を示すペプチドの生産が確認された。前駆体遺伝子との比較により、脱水が 5 ユニット生じていることが確認された。脱水アミノ酸およびランチオニン等の異常アミノ酸の存在が予想され、現在詳細な構造解析を行っているところである。また、遺伝子置換実験により組換えペプチドの生産も行ったので、その結果も発表する。

Ribosome translational post-translational modified biosynthetic peptides (RiPPs) is one class of secondary metabolite of bacteria. Among RiPPs, there is a peptide called lanthipeptide containing unusual amino acids such as lanthionine. Actinomycetes that live in soil have a complex life cycle that produces spores through aerial hyphae formation. The lanthipeptide SapB found in *Streptomyces coelicolor* is a hormone-like substance that induces aerial hyphae formation (Kodani *et al.* PNAS 2004). Our recent genome mining research has revealed several genes similar to the SapB biosynthetic genes in *Bacillus*. We conducted gene expression experiment of a gene cluster existing in the genome of *Bacillus amyloliquefaciens*, using *Escherichia coli*. As a result, the production of a peptide showing *m / z* $[M + H]^+$ 1319.6 was confirmed in the positive ion mode ESI-MS. Comparison with the amino acid sequence of precursor gene confirmed that 5 units of dehydration occurred in the biosynthesis. The existence of unusual amino acids such as lanthionine is expected, and detailed structural analysis is currently on going. We also produced recombinant peptides through site directed mutagenesis experiments.

heterologous production, lanthipeptide, *Bacillus*

講演番号：2G05-06
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 11:00～ ミーティングルーム G

Isolation and structural analysis of novel cholesterol-lowering metabolites in red yeast rice fermented by *Monascus pilosus*

○Yuki HIGA, Hiroyuki Fukami (R&D Center, Kobayashi Pharmaceutical Co., Ltd)

【Introduction】

Red yeast rice is grown on rice by *Monascus* and has been used as a chinese medicine for a long time and as a food in Taiwan and Japan. In recent years, there have been reports of pharmacological actions such as lowering cholesterol and blood pressure. We reported the whole genome analysis of *M.pilosus* NBRC4520 (Higa *et al.,* 2020 BMC genomics). As a result, it was clarified that *M.pilosus* NBRC4520 has 21 sets of genes that synthesize secondary metabolisms. To date, there are only three research reports on the genes related to the secondary metabolism. Therefore, it is suggested that there are still unknown secondary metabolites in red yeast rice.

【Purpose】

In this study was to search for unknown metabolites from fermented rice using *M.pilosus* NITE BP-417, and to determine the structure and evaluate the pharmacology activity.

【Method】

M.pilosus NITE BP-417 was cultured in potato dextrose liquid medium. The liquid-cultured cells were inoculated into steamed rice and cultured. The obtained culture was sterilized, dried and crushed. The crushed powder was extracted with MeOH. Extracts were fractionated using the SHIMADZU-Prominance preparative system. The obtained fraction was freeze-dried. This fraction was prepared at 1 mg/ml and the inhibitory activity of human HMG-CoA reductase was evaluated. Q-TOF MS and 1HNMR analysis were performed on the fractions showing inhibitory activity.

【Results】

The results of the HMG-CoA reductase inhibition assay confirmed a wide range of inhibitory activity. Q-TOF MS and 1HNMR were measured for 4 fractions of the obtained. The results were estimated to be Monacolin L, Monascinol, and Monascodilone. The remaining one fraction was estimated to be C28H44O5 from the Q-TOF MS results. However, the results of 1H-NMR did not match in the previous reports, suggesting that it is a novel compound. Currently, purification and analysis are in progress to determine the structure.

Red yeast rice, fermentation, HMG-CoA reductase inhibitor

発表責任者：比嘉　悠貴（y.higa@kobayashi.co.jp）

講演番号：2G05-07
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 11:00～ ミーティングルーム G

抗腫瘍活性の向上を指向した、計算化学に基づくランカサイジンの誘導体化
Structural modification of lankacidin analogues to improve anti-tumor activity through computational simulation

○西浦 菜摘[1]、MUSLIMIN Rukman[2]、ELREFAIY Mohamed[3]、森田 洋行[4]、AYOUB Ahmed[5]、荒川 賢治[1,2] ([1]広島大院・統合生命、[2]広島大院・先端研、[3]Zewail City of Science and Technology、[4]富山大院・和漢医薬学総合研究所、[5]Heliopolis Univ.)
○ Natsumi NISHIURA[1], Rukman MUSLIMIN[2], Mohamed ELREFAIY[3], Hiroyuki MORITA[4], Ahmed AYOUB[5], Kenji ARAKAWA[1,2] ([1]Grad. Sch. Integr. Sci. Life, Hiroshima Univ., [2]Grad. Sch. AdSM, Hiroshima Univ., [3]Zewail City of Science and Technology, [4]Institute of Natural Medicine, University of Toyama, [5]Heliopolis Univ.)

【目的】*Streptomyces* 属放線菌は、抗生物質を始めとした多くの二次代謝産物を生産することで知られている。*Streptomyces rochei* 7434AN4 株は 17 員環カルボサイクリックポリケチド Lankacidin C (LC) を生産する。微小管安定化作用を持つ抗がん剤に着目して計算機シミュレーションを行ったところ、候補化合物 M51 が算出された(J. Mol. Graph. Model. 2013, 44, 188-196)。M51 は新規骨格であり化学合成に非常に労力を要するため、構造重ね合わせで天然物から探索したところ、LC が該当した。さらに、実験的に LC の微小管安定化作用を証明した(J. Med. Chem. 2016, 59, 9532-9540)。本研究では、さらなる抗腫瘍活性向上のため、LC 誘導体を構築し、本化合物群の高機能化を目指した。
【方法・結果】まず、LC の微小管安定化作用を調べたところ、IC_{50} = 200 μM 程度の活性を示した。そこで LC を出発原料に様々な誘導体の取得を試みた。計算機シミュレーションを行ったところ、LC の 7 位水酸基誘導体化が微小管への結合アフィニティを高めることが示唆された。そこで、7 位水酸基のアセチル化反応を試みることにした。まず無水酢酸を用いて 7 位モノアセチル体、13 位モノアセチル体、7,13 位ジアセチル体を得た。C-7 アセチル体の活性は予測どおり向上し、C-13 アセチル体、C-7,13 アセチル体の活性も向上した。さらに、活性発現における δ ラクトン構造の必要性を評価するため、これを有さない化合物 Lankacyclinone C の化学合成を試みた。LC に対して直接脱炭酸反応を行ったところ複雑な化合物を与えたため、*in vivo* 酵素変換を組み合わせ、変換反応を行った。まず、出発原料に 24 位が水酸基である Lankacidinol A を用い、K_2CO_3 による脱炭酸反応により Lankacyclinol, 2-*epi*-lankacyclinol を取得した。その後、LC 生合成最終段階の酸化反応 (Lankacidinol → LC) を司る PQQ 要求性デヒドロゲナーゼ Orf23 を用いて Lankacyclinol の水酸基をカルボニル基に変換し、Lankacyclinone C を取得した。

We revealed that 17-membered carbocyclic polyketide, lankacidin C, has considerable anti-tumor activity against several cell line models. This finding provides a starting point for the chemical modification of the lankacidin analogues to improve their antitumor activity. In this study, several lankacidin analogues were obtained by chemical synthesis and *in vivo* bioconversion. We found that acetylation of lankacidins enhanced their antitumor activity. We also investigated the importance of δ-lactone structure in lankacidins, which is also described in this symposium.

organic synthesis, secondary metabolite, actinomycetes

発表責任者：荒川賢治（karakawa@hiroshima-u.ac.jp）

講演番号：2G05-08
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 11:00～ ミーティングルーム G

Biosynthetic Studies on the Conversion of Pseudosugar in Acarbose

○Takeshi TSUNODA, Sachin Burade, Arash Samadi, Taifo Mahmud (Oregon State University)

【背景】Acarbose は放線菌により生産される擬似四糖構造の二次代謝産物であり、二型糖尿病に対する治療薬である。アメリカにおける市場は 20 億円と産業上非常に有用な化合物でありながら、その生合成の全容は解明されていない。これまでに生合成遺伝子クラスター (*acb* クラスター) が明らかになっており (Apeleret al. 2001)、また、七炭糖である sedoheptulose 7-phosphate を出発物質として 5 つの酵素によりリン酸化擬似糖である valienol 7-phosphate (V7P) が得られることが *in vitro* で解明されている (Stratmann et al. 1999, Zhang et al. 2002, Zhang et al. 2003, Zhao et al. 2020)。しかしこの後にどのような変換を受けるのか、また、どのように他の糖部位と連結するのかは明らかになっていない。そこでアカルボースの生合成の全容を *in vitro* で詳細に明らかにすることを目的として研究に着手した。
【実験、結果】まず、擬似糖鎖構造を構築するための鍵酵素は AcbS であると配列情報から推定した。続いて AcbS の基質を供給するヌクレオチド転移酵素として AcbR を予想し放線菌より組換えタンパク質を調製した。AcbR の基質候補として valienol 1-phosphate (V1P)、1-epi-V1P、valienol 1,7-diphsphate (V1,7dP)と 1-epi-V1,7dP が想定されたためこれらすべてを D-グルコースより有機合成によりそれぞれ調製し (Jongtae et al. 2011)、ATP、UTP、GTP、CTP、dTTP とそれぞれ反応させた。その結果、GTP と V1P を用いた際に GDP-valienol の生成を確認した。続いて、脱リン酸化酵素と予想される AcbJ の組換えタンパク質を放線菌より調製し V1,7dP と反応させたところ V1P の精製が確認された。これより(擬似)糖が組み上がる前段階が明らかにされた。

【Abstract】Acarbose is a member of pseudooligosaccharide-derived natural products produced by several Actinomycetes. Acarbose is a commercially and clinically important compound as it is used for the treatment of type II diabetes, however the overall biosynthetic pathway of acarbose has been unclear for a long time. Herein, we report the characterization of AcbJ and AcbR. At first, we prepared valienol 1,7-diposphate phosphatase AcbJ and pseudonucleotidyltransferase AcbR as recombinant enzymes from *Streptomyces lividans*. And then, their substrates including V1P, 1-epi-V1P, V1,7dP and 1-epi-V1,7dP from D-glucose with organic synthesis. AcbJ recognized V1.7dP to get the V1P and V1P was converted into GDP-valienol by AcbR.

Biosynthesis of natural products, Pseudosugar, Actinomycetes

講演番号：2G05-09
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 11:00～ ミーティングルーム G

goadvionin における脂肪酸部位の生合成の解析

Analysis of fatty acyl chain biosynthesis in goadvionins

○小境 陵介、浅水 俊平、尾仲 宏康（東大院・農生科）
○Ryosuke KOZAKAI, Shumpei ASAMIZU, Hiroyasu ONAKA (Univ. of Tokyo)

goadvionin は超長鎖脂肪酸（C_{31}）とリボソーム翻訳後修飾型ペプチド (RiPP)が縮合した構造であり、最近発見された新たなカテゴリーのポリケチド-RiPP ハイブリッド化合物に属する[1]。これまでに、超長鎖脂肪酸と RiPP 間の縮合反応は GNAT スーパーファミリー酵素、GdvG によって触媒されることを報告した[1]。GdvG は CoA 体ではなく ACP にロードされた脂肪酸を基質とするため、鎖長の異なる様々な脂肪酸（C_2-C_{18}）も RiPP へ転移できる。このことは、超長鎖脂肪酸（C_{31}）が ACP にロードされる以前のステップで基質認識されることを示唆している。そこで、本研究では超長鎖脂肪酸（C_{31}）生合成の解明を目指した。最初に開始基質と予想された $^{13}C_6$ 標識リジンを用いて安定同位体取り込み実験を行ったところ、質量数が 5 増加した goadvionin が確認され、メチル化修飾を受けたリジンが開始基質であることが示唆された。次に、アシル CoA 合成酵素をコードする *gdvL*、Type II ケトシンターゼをコードする *gdvFB* の遺伝子破壊株の代謝物を LC-MS 解析に供した結果、*ΔgdvL* では脂肪酸中間体 X (図 1)が蓄積し、*ΔgdvFB* では脂肪酸の生産が確認できなかった。中間体 X の推定構造から、脂肪酸部位が GdvFB による縮合反応の繰り返しによって生合成されること、超長鎖脂肪酸（C_{31}）に存在する五つの水酸基は、脱水還元過程がスキップされることで生じることが示唆された。

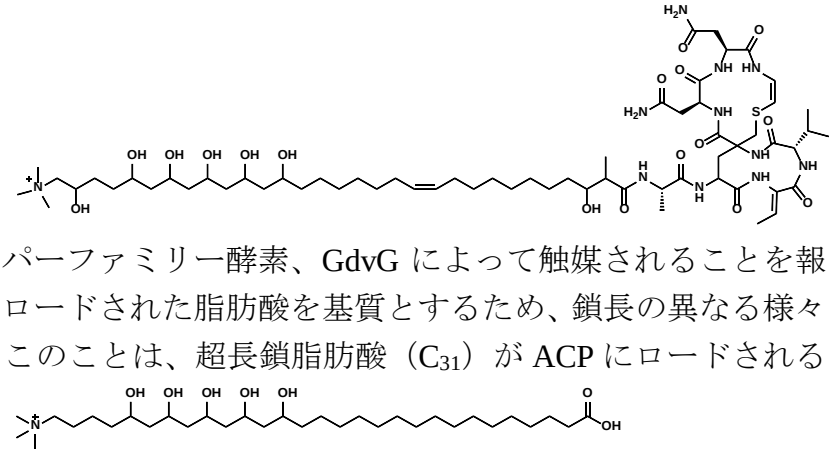


図 1　goadvionin A1（上）と中間体 X（下）の化学構造式

Goadvionins are PK-RiPP hybrid compounds consisting of a very long chain fatty acid (C_{31}) and a ribosomally synthesized and post-translationally modified peptide (RiPP), which is a very recently discovered class of natural products[1]. We previously reported that the condensation reaction between an acyl chain loaded on ACP and a peptide is catalyzed by GNAT superfamily enzyme, GdvG [1]. GdvG had broad substrate tolerant and accepted fatty acids with different chain lengths, so the gete keeper to select the fatty acid moiety in goadvionin was suggested to be existed in upstream of the biosynthetic pathway. In this presentation biosynthetic characterization of fatty acid moiety will be discussed.

[文献]　[1] Kozakai, R., *et al.* (2020). *Nature Chemistry*, 12(**9**), 869-877.

Actinomycetes, Biosynthesis, Secondary metabolite

講演番号：2G05-10
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 11:00～ ミーティングルーム G

type II AmCP を介して生合成される新規アミノ酸の同定及び生合成に関する研究
Identification of a novel amino acid and biosynthesis using type II AmCP.

○曽根 祐輔[1]、Muhammad Prima PUTRA[1]、松田 研一[1]、古園 さおり[1,2]、西山 真[1,2] ([1]東大・生物工学セ、[2]東大・微生物連携機構)
○Yusuke SONE[1], Muhammad Prima PUTRA[1], Kenichi MATSUDA[1], Saori KOSONO[1,2], Makoto NISHIYAMA[1,2] ([1]BRC, UTokyo, [2]CRIIM, UTokyo)

Amino-group carrier protein: AmCP は、好熱菌や古細菌のリジン・アルギニン生合成から見出され放線菌においても二次代謝の生合成に関与していることが明らかとなっている。これまでに知られている AmCP（type I AmCP）はいずれも、C 末端に「EDWGE」という保存されたモチーフを有しており、この C 末端にあるグルタミン酸と基質とがイソペプチド結合することによりキャリアタンパク質として機能する。しかしながら C 末端の保存モチーフが「RDWGQ」となっている特異な AmCP（type II AmCP）を発見した。さらに type II AmCP を含む遺伝子クラスターは天然では非常に珍しいマレイミド骨格を有するマレイマイシン生合成に関与していた。これまでに我々は、Orf12（glutamine amidotransferase homolog）により type II AmCP の C-末端のグルタミン残基がグルタミン酸残基に翻訳後修飾され、基質であるグルタミン酸が AmCP 上にロードされることを報告している。今回我々は AmCP 上にグルタミン酸がロードされた後の反応を *orf15*(aminotransferase homolog)破壊株の蓄積した化合物の解析と組換えタンパク質を用いた in vitro 再構築を行い、新規非タンパク質性アミノ酸 7-amino-4-hydroxy-2-oxooctanedioic acid が生産されることを明らかにした。また、*orf12* 破壊株と *orf15* 破壊株の共培養によりマレイマイシン類の生産が回復したことから本化合物が中間体であると予想している。さらに、本発表では、他の中間体や生合成遺伝子の機能も含めてマレイマイシンの生合成に関する最新の知見について報告する。

Amino-group Carrier Protein (AmCP) is involved in lysine and arginine biosynthesis in some bacteria and archaea. Furthermore, a similar AmCP-system is also used in secondary metabolite biosynthesis of some *Streptomyces* species. Biosynthesis using AmCP starts from the attachment of the amino group of a substrate at the C-terminal glutamate residue of AmCP through isopeptide-bond linkage. Therefore, the C-terminal glutamate residue is critical for AmCP to function. Recently, we discovered a different-type of AmCP (type II AmCP) with a glutamine residue at the C-terminus in some *Streptomyces* species. We are revealing that a gene cluster containing a type II *amcp* gene is involved in the biosynthesis of maleimycin, which has a rare maleimide moiety. Here we present the type II AmCP-mediated natural product biosynthesis. We found out that *orf15*(aminotransferase homolog) disruptant strain produces 7-amino-4-hydroxy-2-oxooctanedioic acid as an intermediate and also detected this compound in in vitro reconstitution using recombinant proteins. In this presentation, we would like to share the latest findings on the biosynthesis of maleimycin, including the functions of other biosynthetic genes.

AmCP, natural product, Streptomyces

講演番号：2G05-11
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 11:00～ ミーティングルーム G

スクアレン合成酵素に似た放線菌由来芳香族プレニル基転移酵素の構造学的研究
Structural study of a new aromatic prenyltransferase that resembles squalene synthase
○永田 隆平[1,2]、末宗 周憲[3]、山本 将輝[3]、小林 正弥[1]、品田 哲郎[4]、西山 真[5,6]、永野 真吾[3]、葛山 智久[1,6]（[1]東大院・農生科、[2]日本学術振興会特別研究員 PD、[3]鳥取大院工、[4]大阪市大・理、[5]東大・生物工学セ、[6]東大・CRIIM）
○ Ryuhei NAGATA[1,2], Hironori SUEMUNE[3], Masaki YAMAMOTO[3], Masaya KOBAYASHI[1], Tetsuro SHINADA[4], Makoto NISHIYAMA[5,6], Shingo NAGANO[3], Tomohisa KUZUYAMA[1,6]（[1]GSALS, UTokyo, [2]JSPS Research Fellow PD, [3]Grad. Sch. of Eng., Tottori Univ., [4]Faculty of Science, Osaka City Univ., [5]BRC, UTokyo, [6]CRIIM, UTokyo）

二次代謝で見られる芳香族プレニル基転移酵素（PT）は、配列上に Asp リッチモチーフをもたず、特徴的なバレル構造を有することで知られる。我々は、放線菌 *Streptomyces* sp. CS79 のカルキノスタチン A 生合成経路において、既知の芳香族 PT と配列相同性を示さない新規酵素 CqsB4 を見出した[1,2]。本酵素は、芳香環を有するプレカルキノスタチンへのジメチルアリル基の転移反応を触媒する。しかし、スクアレン合成酵素と最も高い配列相同性を示し、プレニル二リン酸の結合に重要な 2 つの Asp リッチモチーフも保存している。本研究では、この酵素の反応機構を明らかにするために、結晶構造解析に取り組んだ。

CqsB4 はゲルろ過クロマトグラフィーにおいて多分散性を示し、結晶化に適さなかったが、ホモログである LvqB4 において結晶が得られた。LvqB4 とプレカルキノスタチンとの共結晶をプレニルドナー類縁体溶液へ浸漬することにより三者複合体結晶を作製し、X 線回折データを収集した。Se-SAD 法によって位相を決定し、最終的に 1.70 Å 分解能で三者複合体構造を決定した。全体構造はスクアレン合成酵素と共通しており（RMSD 3.0 Å）、2 つのアスパラギン酸リッチモチーフも立体構造上よく重なる位置に存在していた。発表では、構造に基づいた変異体解析の結果も合わせて、これらの酵素の反応機構について議論する。

Aromatic prenyltransferases (PTs) in secondary metabolism share a common barrel structure and lose Asp-rich motifs. Recently, we identified a new aromatic PT, CqsB4 [1,2], which shows sequence similarity not to known aromatic PTs but to squalene synthases and conserves two Asp-rich motifs important for prenyl diphosphate binding. In this study, we aimed to structurally reveal a reaction mechanism of this enzyme.

CqsB4 was not suitable for crystallization because of its polydispersity, while crystals of a homolog enzyme, LvqB4, were obtained. A tertiary complex structure of LvqB4, precarquinostatin, and a prenyl donor analog was determined at 1.70 Å resolution. Its overall structure is similar to that of human squalene synthase (RMSD 3.0 Å). The positions of two Asp-rich motifs in LvqB4 are well superposed on those in squalene synthases. In our presentation, we will discuss a reaction mechanism based on the crystal structure and mutational analysis.

[1] M. Kobayashi, *et al. Angew. Chem. Int. Ed.* (2019) **58** 13349-53. [2] M. Kobayashi and T. Kuzuyama *Biomolecules* (2020) 10. 1147.

Biosynthesis, Crystal structure, *Streptomyces*
発表責任者：葛山智久（utkuz@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2G05-12
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 11:00～ ミーティングルーム G

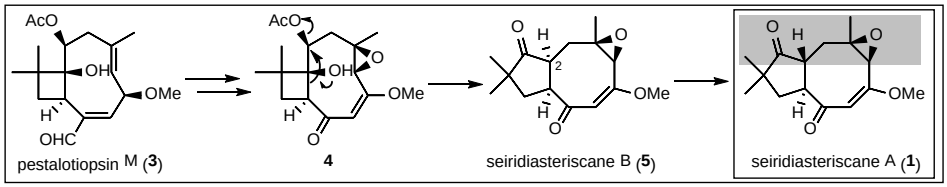
推定生合成経路を模倣した pestalotiopsin B から seiridiasteriscane 骨格への合成化学的変換

Biomimetic chemical transformation of pestalotiopsin B into a seiridiasteriscane skelton

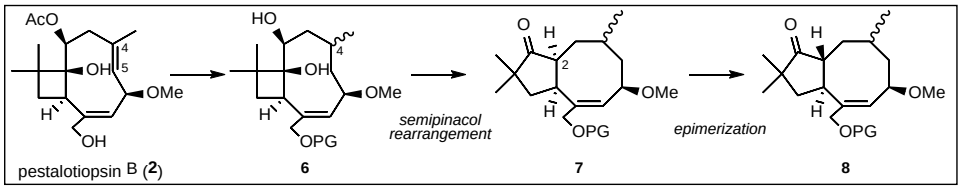
○石橋 理[1]、西山 真未[2]、權 垠相[3]、橋本 勝[2]、桑原 重文[1]、榎本 賢[1] ([1]東北大院農、[2]弘前大院農、[3]東北大院理)

○ Osamu Ishibashi[1], Mami Nishiyama[2], Eunsang Kwon[3], Masaru Hashimoto[2], Shigefumi Kuwahara[1], Masaru Enomoto[1] ([1]Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University, [2]Hirosaki Univ., [3]Graduate School of Science, Tohoku University)

【背景・目的】 Seiridiasteriscane A (**1**) は、ミズキ科の樹木 *Cornus offocinalis* に生息する糸状菌 *Seiridium* sp. KT3957 より単離・構造決定された 5/8 縮環型セスキテルペンの一種である[1)]。共通の菌体培養液から 4/9 縮環型天然物である pestalotiopsin B (**2**) および M (**3**) が **1** とともに単離されたこと、および **1** と pestalotiopsin 類の構造の関連性から、**1** は pestalotiopsin 類より、セミピナコール転位と C2 位のエピマー化を経て生合成されると提唱されている。筆者はこの推定生合成経路を裏付けるべく、**2** を用いて **1** が有する 5/8 縮環型骨格への合成化学的変換を試みることにした。



【方法・結果】**2** から環内 C4-C5 *trans* 二重結合の還元を含む数工程の変換により **6** へと導いたのちに、C4 位における両エピマーそれぞれを塩化メタンスルホニルで処理したところ、いずれのエピマーからも期待どおりにセミピナコール転位反応が進行し、5/8-*cis* 縮環型骨格を有する **7** が生成した。さらに、比較的温和な条件下で C2 位におけるエピマー化が進行して **8** が生成することも明らかとなった。



Seiridiasteriscane A (**1**) is an asteriscane-type norsesquiterpene isolated from *Seiridium* sp. KT3957.[1)] Based on the fact that pestalotiopsins B (**2**) and M (**3**) were co-isolated with **1**, the biosynthesis of **1** was proposed to involve a semipinacol rearrangement of putative intermediate **4**, which may be derived from **3**, and subsequent epimerization at the C2 position of the resulting product **1**. Thus, we aimed for chemical transformation of a pestalotiopsin derivative into an asteriscane-type skeleton. As expected, treatment of **6**, which was prepared from **2**, with methanesulfonyl chloride brought about the semipinacol rearrangement to give 5/8-fused ketone **7** from both epimers of **6**. The *cis*-fused ketone **7** underwent epimerization at C2 position under mild conditions to produce *trans*-fused ketone **8**.

1) M. Hashimoto, *et al*. *Tetrahedron* **2020**, 76, 131197.

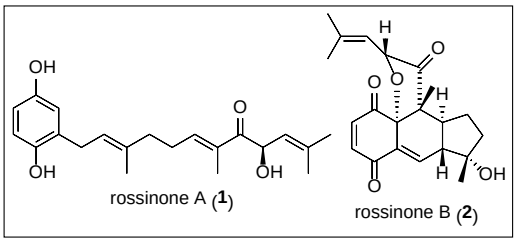
Biomimetic chemical transformation

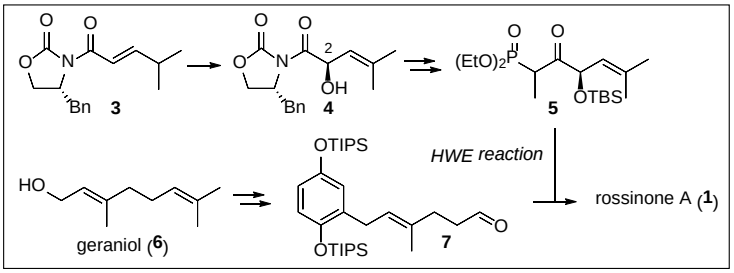
講演番号：2G05-13
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 11:00～ ミーティングルーム G

南極産ホヤ由来メロテルペン rossinone A の全合成

Synthetic Study of Rossinone A, Bioactive Meroterpenoids Isolated from an Antarctic Ascidian

○齋藤 克哉、倉沢 一輝、滝野 ちあき、桑原 重文、榎本 賢（東北大院農）
○ Katsuya SAITO, Kazuki KURASAWA, Chiaki TAKINO, Shigefumi KUWAHARA, Masaru ENOMOTO (Tohoku university graduate school of agricultural science)





【背景・目的】Rossinone A (**1**)と B (**2**)は 2009 年に Copp らによって、南極のロス海に生息するホヤ *Aplidium* sp.から単離・構造決定されたメロテルペンであり [1]、マウス白血病細胞 P388 に対する抗増殖活性など様々な生物活性が報告されている。**2** が有する新奇四環性骨格は、**1** から vinyl quinone Diels-Alder (VQDA)反応を含む一連の化学変換によって生合成されると提唱されており [2] 、2010 年には Tang らが生合成模倣による(±)-**2** の全合成を報告した [3]。しかしながら光学活性体合成への適用には困難が予想される合成経路であり **1** 自体の全合成も未だに達成されていない。これより **1** と **2** の初の不斉合成を目的として研究を行った。

【方法・結果】まず、**1** の不斉合成を目指した。非天然型アミノ酸から調製可能な **3** を出発原料として [4]二重結合の異性化を伴う立体選択的な酸化反応により **4** を調製し毛利らの方法を参考に右側セグメント **5** を得た [5]。次に geraniol (**6**) をヒドロキノン誘導体と連結し位置選択的に酸化することで左側セグメント **7** へと導いた。そして得られた両セグメントを HWE 反応にて連結して **1** の初の不斉合成を達成した。1) B. R. Copp *et al*., *J. Org. Chem*. **2009**, *74*, 9195. 2) D. Trauner *et al*. *Angew. Chem. Int. Ed*. **2010**, *49*, 6199. 3) Y. Tang *et al*. *Org*. *Lett*. **2010**, *12*, 5554. 4) S. G. Davis *et al*. *Tetrahedron: Asymmetry*. **2010**, *21*, 1635. 5) T. Mohri *et al. Tetrahedron Letters*, **2017**, *58*, 4011.

Rossinones A (**1**) and B (**2**) are meroterpenes isolated from an Antarctic ascidian by Copp and coworker in 2009, and shown to exhibit several biological properties such as antiproliferative, antiviral, and antimicrobial activities[1]. The biosynthetic pathway of **2** proposed by Trauner and coworker was that the novel 6/6/5 tricyclic ring system of **2** would be constructed via a vinyl quinone Diels–Alder (VQDA) reaction from a precursor derived from **1**[2]. Although the first total synthesis of (±)-**2** was accomplished by Tang and coworker via the bioinspired VQDA strategy, asymmetric synthesis of neither **1** nor **2** has been reported so far[3]. We have recently completed the first asymmetric total synthesis of **1** from an acyl oxazolidinone derivative **3** in a six-step sequence including Davis' oxidation for the installation of the C2 asymmetric stereocenter[4] and the Horner–Wadsworth–Emmons reaction to construct the full carbon skeleton.

total synthesis, natural product

講演番号：2G05-14
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 11:00～ ミーティングルーム G

ポリフェノールアセタート類を基質とする、リパーゼ触媒反応の位置選択性

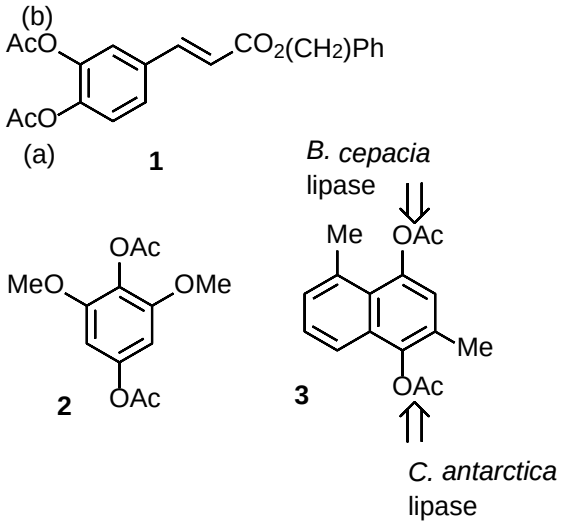
Site-selectivity of lipase-catalyzed transformation on polyphenol acetates

○須貝 威、橋本 理一、花屋 賢悟、東林 修平（慶應大薬）
○Takeshi SUGAI, Riichi HASHIMOTO, Kengo HANAYA, Shuhei HIGASHIBAYASHI（Keio Univ.）

加水分解触媒の一種リパーゼはさまざまな種類が容易に入手可能である。有機溶媒中では、加水分解における本来の求核剤である水に代わり、アルコールが作用(エステル交換)し、フェノール酢酸エステルを基質とした場合、脱アセチル化が可能である [1)]。本研究では、生物活性物質の効率よい合成に向け、触媒機能の「位置選択性」を検証した。その方法としては、有機溶媒中、分子内に複数のフェノール性酢酸エステルを有する基質に対し、第二級アルコールを求核剤とする脱アシル化を試みた。反応の位置選択性は、生成物の TLC, NMR 分析等により決定した。

カフェ酸誘導体ジアセタート 1 を基質として用いた場合、*Candida antarctica* リパーゼ B(Nozozyme 435)による反応は段階的に進行し、求電子性の高い位置(a)が優先的に脱アセチル化されたが、反応進行とともにジオールに収束した。*Burkholderia cepacia* 由来のリパーゼ(アマノ PS)では速やかに 2 か所とも脱アセチル化された。

ヒドロキノンジアセタート **2** を基質として、2-プロパノールを求核剤とする脱アセチル化を試みた場合、上記二種のリパーゼは相補的な位置選択性を示した。このような相補的な位置選択性はナフトヒドロキノンジアセタート **3** を基質とした場合に観察されている [2)]。



Lipase-catalyzed deacetylation is potent way for the site-selective transformation of polyphenols. In the present study, the site-selectivity by *C. antarctica* lipase B (Novozym 435) and *B. cepacia* lipase (Amano PS) were examined by applying caffeic acid ester diacetate **1** and hydroquinone diacetate **2** as the substrates.

1) R. Tsunekawa, *et al.*, in “Future Directions in Biocatalysis (Second Edition)”, T. Matsuda, ed., pp, 279-295, Elsevier (2017).
2) R. Hashimoto, *et al.*, *Heterocyces*, **2019**, *99*, 625.

lipase, site-selective deacetylation, polyphenolic acetates

発表責任者：須貝 威（sugai-tk@pha.keio.ac.jp）

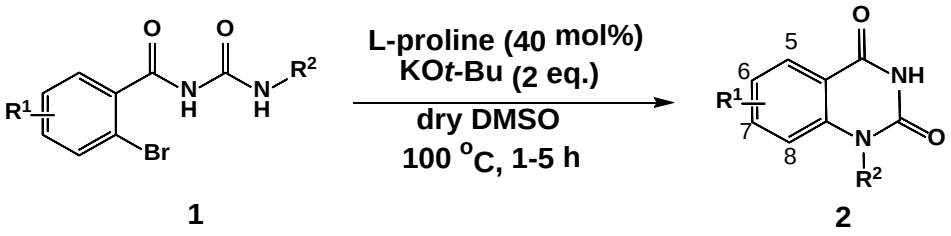
講演番号：2G05-15
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 11:00～ ミーティングルーム G

L-Proline を触媒に用いたキナゾリノン類縁体の環境調和型合成法の開発

Proline-Promoted Metal-free Access to 1-Substituted-4-Quinazolinones

○槙山 浩平、徳本 健人、園田 素啓、谷森 紳治（阪府大院生命環境）
○ Kouhei MAKIYAMA, Kento TOKUMOTO, Motohiro SONODA, Shinji TANIMORI（Osaka Prefecture Univ.）

4-キナゾリノンは催眠・鎮静作用などの多様な生物活性を持ち、さらに癌の治療に対する利用も提案されるなど有力な薬剤候補化合物として注目されており、簡便で効率的な 4-キナゾリノンの合成法の開発が求められている。



1

2

R¹=H, **R²**=Ph (84%)
R¹=H, **R²**=*p*-OMe-C_6H_4 (82%)
R¹=H, **R²**=*p*-OCF_3-C_6H_4 (75%)
R¹=H, **R²**=*m*-Cl-C_6H_4 (87%)
R¹=6-Br, **R²**=Ph (90%)
R¹=6-OMe, **R²**=Ph (83%)
R¹=6-F, **R²**=Ph (86%)
R¹=6-OMe, **R²**=*p*-OMe-C_6H_4 (62%)

我々は有機分子触媒に着目し、2-ブロモベンズアミドとフェニルイソシアネートから合成したウレア体 **1** に対し、L-プロリン (40 mol%)、KO*t*-Bu (2.0 eq.) 存在下、無水 DMSO 中、100 ℃で反応させたところ、分子内 C-N カップリング反応が進行し、4-キナゾリノン類縁体 **2** が高収率で得られることを見出した。これまでに本反応を用いて、新規化合物を含む 21 種の *N*-1 置換キナゾリノン類縁体の合成を達成している。また、グラムスケール合成においても同程度の収率(80%)で生成物が得られることを確認した。さらに、2-ブロモベンズアミドとフェニルイソシアネートを出発原料に用いることにより中間体 **1a**(R^1=H, R^2=H)の単離が不要なワンポット合成も可能であることが分かった。現在、更なる 4-キナゾリノン類縁体の合成を検討している。

4-Qinazolinone is an attractive compound as a promising drug candidate with various biological activities such as hypnotic and sedative effects. Therefore, the development of a convenient and efficient synthetic method has been desired. Focusing on the use of an organocatalyst, we found the intramolecular C-N coupling reaction of urea **1** in the presence of L-proline and KO*t*-Bu in anhydrous DMSO at 100 ℃ giving a 4-quinazolinone analogue **2**. Using this reaction, 21 *N*-1-substituted quinazolinone analogues, including several new compounds, have been synthesized up to now. Moreover, a gram-scale synthesis of **2** was achieved in good yield. A one-pot synthesis starting from 2-bromobenzamide and phenylisocyanate without an isolation of the intermediate **1a** was also performed.

transition-metal free, readily available starting materials, valuable products

講演番号：2G05-16
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 11:00～ ミーティングルーム G

α-不斉アリール化反応を利用した equol 誘導体の合成

Synthesis of Equol Derivatives via Asymmetric α-Arylation

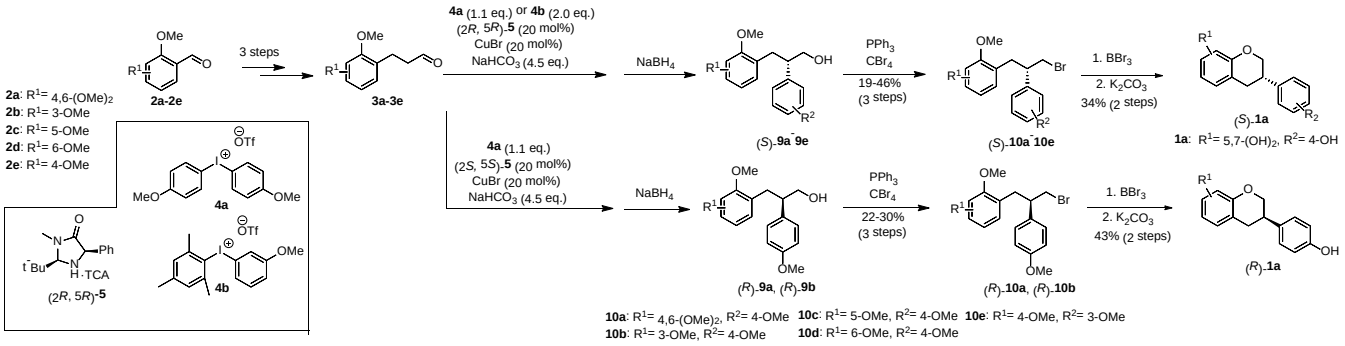
○植村 隆人[1]、福井 菜月[2]、園田 素啓[1]、谷森 紳治[1] ([1]阪府大院生命環境、[2]阪府大生命環境)
○ Takahito UEMURA[1], Natsuki FUKUI[2], Motohiro SONODA[1], Shinji TANIMORI[1] ([1]Osaka Prefecture Univ., [2]Osaka Pref. Univ.)

Equol 誘導体には、エストロゲン活性のほか、抗菌・抗癌等の有用な生理活性を有するものが知られており、その構造活性相関について興味が持たれている。最近、我々はアルデヒドの α-不斉アリール化を利用した equol の不斉合成に成功している(2020 年度 日本農芸化学大会)。そこで今回、この合成法を利用して抗肝癌活性が期待される 5-hydroxyequol の不斉合成を行うとともに、水酸基の位置が異なる equol 類縁体の合成について検討したので、その結果について報告する。

2,4,6-Trimethoxybenzaldehyde (**2a**)からドブナー法、$LiAlH_4$ 還元、PCC 酸化により誘導されるアルデヒド **3a** に対し、臭化銅(I)と(2*R*, 5*R*)-**5** または(2*S*, 5*S*)-**5** の触媒存在下、ヨードニウム塩 **4a** を作用させたのち、還元して 1 級アルコール(*S*)-**9a**, (*R*)-**9a** とした。続いてアッペル反応、脱保護、分子内環化を経て、(*S*)-5-hydroxyequol ((*S*)-**1a**) ならびに (*R*)-5-hydroxyequol ((*R*)-**1a**) をそれぞれ 90%*ee*、88%*ee* の不斉収率で得た。次に、この合成法に dimethoxybenzaldehyde **2b-2e** と **4b** を適用して同様の操作を行い、水酸基の位置が異なる equol 類縁体の合成に取り組んだ。現在、ブロミド **10** まで誘導している。

Some equol derivatives are known to show significant physiological activities, such as anti-bacterial and anti-cancer activity and a research on their structure-activity correlation is important. As an extension of our recent results of the synthesis of equol *via* asymmetric α-arylation, we examined the asymmetric synthesis of 5-hydroxyequol ((*S*)- and (*R*)-**1a**) and some equol analogs whose hydroxy group is substituted at different position.

Introduction of an aryl group at α-position of aldehyde was performed by the reaction of **3a**, derived from **2a**, with **4a** in the presence of CuBr(I) and **5**. Bromination of **9a** affording **10a**, followed by deprotection and intramolecular cyclization of **10a** gave (*S*)-**1a** or (*R*)-**1a** with good enantiomeric purity (90%*ee* or 88%*ee*, respectively). In addition, the syntheses of equol analogs are currently in progress using **2b-2e** and **4b**.



equol, 5-hydroxyequol, asymmetric α-arylation

講演番号：2G06-01
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 13:00～ ミーティングルーム G

ストリゴラクトンシグナルがイネに病害抵抗性を付与する機構の解明

Mechanisms of pathogen resistance induced by SL signaling in rice

○中村 英光[1]、伊藤 瑛子[1]、髙木 光佑[1]、山野 博之[1]、前田 哲[2]、神田 恭和[2]、草島 美幸[1]、藤田 萌香[3]、仲下 英雄[3]、森 昌樹[2]、浅見 忠男[1]([1]東大院農生科、[2]農研機構生物研、[3]福井県立大生物資源)

○Hidemitsu NAKAMURA[1], Akiko Itou[1], Kousuke Takagi[1], Hiroyuki Yamano[1], Satoshi Maeda[2], Yoshikazu Kanda[2], Miyuki Kusajima[1], Moeka Fujita[3], Hideo Nakashita[3], Masaki Mori[2], Tadao Asami[1] ([1]Univ. of Tokyo, [2]NARO, [3]Fukui Pref. Univ.)

ストリゴラクトン（SL）は植物ホルモンの一種であり、枝分かれ抑制作用をはじめ、根の発達や環境ストレス応答など様々な作用を示す。また、植物は病原菌に感染されると、活性酸素種を発生させたり抗菌性の二次代謝産物であるファイトアレキシンを産生させたりして病害から身を守る応答をする。この病害抵抗性は複数の植物ホルモン信号伝達のネットワークにより精密に制御されている。我々は、イネの SL 受容体 D14 の過剰発現体(D14ox)が葉身に疑似病斑を形成することや、いもち病菌への抵抗性が向上していることをこれまでに見出しており、また、*d14* 欠損変異体はいもち病菌に対し高い感受性を示すことも見出している。本研究では、植物に病害抵抗性を付与する新たな方法を確立する目的で、この D14 過剰発現による病害抵抗性の誘導機構の詳細を明らかにすることにした。

D14ox がいもち病抵抗性を示すのは SL シグナルが病害応答シグナルを活性化しているからなのかを確かめるために、野生型のイネに SL 生合成阻害剤を投与したところ、いもち病菌への抵抗性が低下していた。D14ox における遺伝子発現パターンを網羅的に調べるために RNAseq 解析を行い、D14ox で多くの病害抵抗性関連遺伝子の発現が上昇しているのを観察した。本発表ではその傾向を報告し、病害抵抗性付与のメカニズムを考察したい。

Strigolactones (SLs) are a class of phytohormones, which regulate shoot branching, root development and responses to various environmental stresses. Once infected by pathogens, plants protect themselves from them by various procedures such as generating reactive oxygen species and producing antibacterial secondary metabolites, phytoalexins. Disease resistance is highly regulated by the network of multiplex plant hormone signaling. We previously discovered that the overexpression of *D14* gene in rice, which encodes an SL receptor, confers resistant to rice blast and the *d14* mutant rice is highly susceptible to pathogens. Here, we are trying to elucidate how the overexpression of *D14* induces pathogen resistance.

We found that the treatment of TIS108, an SL biosynthesis inhibitor, lowered resistance to rice blast, indicating that the SL signaling regulate susceptibility to pathogens. To investigate how SL signaling induces pathogen resistance, we performed RNAseq analyses and found that many pathogen-resistance related genes in D14ox lines. By dissecting the RNAseq data, we will discuss the mechanisms of pathogen resistance in D14ox rice.

strigolactone, disease resistance, D14

発表責任者：中村英光（ahide87@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2G06-02
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 13:00～ ミーティングルーム G

共有結合型受容体阻害剤を用いたストリゴラクトン生理作用発現機構の解析

Analysis of strigolactone signal transduction using covalent inhibitors

○大沼 彩香、喜久里 貢、胡 文倩、平山 遼太、中村 英光、浅見 忠男（東大農）
○AYAKA ONUMA, Ko Kikuzato, Wenqian Hu, Ryota Hirayama, Hidemitsu Nakamura, Tadao Asami (Univ. of Tokyo)

ストリゴラクトン（SL）は根寄生雑草ストライガの種子発芽促進物質として、また枝分かれ抑制など多様な活性を持つ植物ホルモンとして知られている。SL はセリン加水分解酵素ファミリーに属し加水分解活性を持つ D14 タンパク質により受容される。そして D14 が SL を受容することが引き金となり、枝分かれ促進因子 D53、ユビキチンリガーゼ複合体のサブユニット D3 との三者複合体形成が誘導され、D53 の分解が促進し、枝分かれが抑制されることが明らかとなっている。しかし、この三者複合体形成の詳細な機構は明らかになっていない。

私達の研究室では既存のセリン加水分解酵素阻害剤のうち，哺乳類細胞において触媒活性中心 Ser 残基に不可逆的に共有結合し加水分解活性を強力に阻害する 1,2,3-トリアゾール系化合物に着目し、トリアゾール尿素を基本骨格とする KK 化合物を 140 種類以上合成した。その中から D14 のセリン残基に共有結合し、D14 による SL 受容を強力に阻害する共有結合型阻害剤 KK094 を見出している。

一方、この阻害剤のスクリーニングの過程で、D14-D3 の複合体形成を促進しないものの、D14-D53 の複合体形成を促進する化合物も見出している。この化合物は D14-D53-D3 三者複合体形成解明のための有用なツールになると考えている。本発表ではこれら D14-D53 の複合体形成を促進する KK 化合物の類縁体について、化合物による D14 の安定性への寄与や D14-D53 複合体形成促進活性を評価し、D14-D3 と D14-D53 の結合メカニズムの違いについて考察した。

SLs are a class of plant hormone with multiple functions including a regulation of shoot branching and are received by the receptor D14, which belongs to the serine hydrolase family. The perception of SL by D14 triggers the formation of a tripartite complex with the branching promoting factor D53 and D3, which is the subunit of a ubiquitin ligase complex, promotes the degradation of D53 and finally suppresses branching. However, the detailed mechanism of this tripartite complex formation has not been clarified.

We previously identified potent strigolactone antagonists, which covalently bind to D14, from an array of triazole urea compounds (named KK compounds). We examined if each KK compound contributes to the stability of D14 and the formation of D14-D53 / D14-D3 complex. On the basis of the results from these experiments, we will discuss the difference between the formation of those two complexes.

Strigolactone, plant hormone, DWARF14

講演番号：2G06-03
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 13:00～ ミーティングルーム G

ストリゴラクトン生産を阻害する新規化合物の創製

Research of Novel compound as Strigolactone Biosynthesis Inhibitor

○川田 紘次郎[1]、高橋 郁夫[2]、小野田 聡志[1]、野村 崇人[3]、佐々木 康幸[1]、浅見 忠男[2]、矢嶋 俊介[1]、伊藤 晋作[1] ([1]東京農大・バイオ、[2]東大院・農生科、[3]宇都宮大・バイオ)
○ Kojiro KAWADA[1], Ikuo TAKAHASHI[2], Satoshi ONODA[1], Takahito NOMURA[3], Yasuyuki SASAKI[1], Tadao ASAMI[2], Shunsuke YAJIMA[1], Shinsaku ITO[1] ([1]Tokyo University of Agriculture, [2]The University of Tokyo, [3]Utsunomiya University)

ストリゴラクトン (SL) は枝分かれを調節する植物ホルモンである。一方、根から分泌された SL は宿主植物の生育を抑制する根寄生性植物の発芽物質として作用する。特にアフリカにおける根寄生性植物ストライガは年間 1 兆円以上の農作物被害を起こすと試算されている。

SL 生合成変異体は根寄生性植物による宿主への寄生が減少するため、SL 生合成阻害は根寄生性植物防除に有用と考え、我々は SL 生合成阻害剤研究を行い、トリアゾール誘導体の TIS108, KK5 を見出している。これらの化合物は、イネの主要な SL である 4-デオキシオロバンコール (4DO) の内生量を有意に減少させる。さらに TIS108 はポット試験において根寄生性植物ストライガのイネへの寄生を抑制し、収量を通常生育条件と同程度まで回復させるが、1-5 kg/ha の薬剤量が必要である。そのためアフリカ現地で利用するには大幅な活性向上が必要である。そこで今回、TIS108 や KK5 をリード化合物とし、トリアゾール基の位置の最適化や、トリアゾールを有する基質構造アナログ類の合成により高活性 SL 生合成阻害剤の取得を目指した。

合成した化合物の CYP711A 酵素の阻害活性を反応産物のカーラクトン酸 (CLA) や 4DO 量を定量し評価したとこころ、TIS108 や KK5 より低濃度で阻害する化合物を見出した。また、イネ 4DO 内生量および根滲出量を測定したところ、これまで最も強い活性を有していた KK5 よりも 1/10 以下、TIS108 よりも 1/100 程度の濃度で 4DO 量を低下させる化合物を見出すことができた。

今回見出した化合物は CYP711A をターゲットとし、TIS108 や KK5 より強力に SL 生合成を抑制することが明らかとなった。さらに植物体に大きな形態変化も起こさないことから、実用的な根寄生性植物防除剤の候補になり得ると考えている。

Strigolactones (SLs) are one of the plant hormones that control shoot branching. In addition, SLs are also known as seed germination compounds for root parasitic weed, *Striga*, which is harmful for crops in Africa. Because SL biosynthesis mutants show *Striga* tolerance phenotype, Application of SL biosynthesis inhibitors is a useful method to establish for the *Striga* management system. In this study, to find a potent SL biosynthesis inhibitor, we synthesized the derivatives of TIS108 and KK5, which are known as SL biosynthesis inhibitors, and evaluated the effects of these derivatives. Compound A showed the more potent inhibitory activities of 4DO production in rice than those of TIS108 and KK5. In addition, treatment of this chemical in wild-type rice did not elicit morphological changes. These results indicate that compound A is a novel candidate for controlling Striga damage.

strigolactone, biosynthesis inhibitor, plant hormone

講演番号：2G06-04
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 13:00～ ミーティングルーム G

コケ植物におけるストリゴラクトン生合成

Strigolactone Biosynthesis in Bryophytes

○依田 彬義[1,2]、謝 肖男[2]、島崎 翔太[3]、児玉 恭一[3]、米山 香織[4]、秋山 康紀[5]、嶋村 正樹[6]、経塚 淳子[3]、野村 崇人[2] ([1]東京農工大院・連合農、[2]宇都宮大・バイオ、[3]東北大院・生命科学、[4]愛媛大院・農、[5]大阪府大院・生命環境、[6]広島大院・統合生命)
○Akiyoshi Yoda[1,2], Xiaonan Xie[2], Shota Shimazaki[3], Kyoichi Kodama[3], Kaori Yoneyama[4], Kohki Akiyama[5], Masaki Shimamura[6], Junko Kyozuka[3], Takahito Nomura[2] ([1]United Grad. Sch. of Agri. Sci., Tokyo Univ. of Agri. and Tech., [2]Ctr. for Biosci. Res. & Educ., Utsunomiya Univ., [3]Grad. Sch. of Life Sci., Tohoku Univ., [4]Grad. Sch. of Agri., Ehime Univ., [5]Grad. Sch. of Life & Environ. Sci., Osaka Pref. Univ., [6]Grad. Sch. of Integrated Sci. for Life, Hiroshima Univ.)

ストリゴラクトン（SL）は植物の枝分かれを制御する植物ホルモンとして働くだけでなく、根圏においてアーバスキュラー菌根菌（AM 菌）との共生シグナルとしても働く。SL は β-カロテンから生合成され、カーラクトン（CL）とよばれる 2 環性の生合成中間体が生成される。シロイヌナズナにおいて CL はシトクロム P450 酵素である MAX1（CYP711A1）によりカーラクトン酸（CLA）へ変換される。一方で、イネの MAX1 ホモログである Os900（CYP711A2）は、CL を基質として 4-デオキシオロバンコール(4DO)を生成することが知られており、SL 生合成酵素には植物種における多様性がある。なぜ植物は多様な SL を生産するのか、どの化学構造が活性本体なのかは解っていない。本研究では SL 構造と植物進化の関係を考察するため、基部陸上植物であるコケ植物における SL 生合成の解析を行った。基部陸上植物のモデル植物である苔類のゼニゴケ（*Marchantia polymorpha*）は SL 生合成遺伝子が欠落しており、AM 菌と共生しない。一方、他の苔類の多くは AM 菌と共生しており、それらの苔類は SL を生産している可能性がある。まず、AM 菌と共生するゼニゴケ近縁種の仮根の滲出物を抽出し、SL 検出に用いられる根寄生植物種子の発芽活性試験を行った。その結果、既知 SL とは異なる HPLC 溶出画分に強い SL 活性を発見し、最終的に新規 SL（MaSL）の同定に成功した。さらに MaSL は苔類だけでなくツノゴケ類からも検出された。次に MaSL を生産するゼニゴケ近縁種における MAX1 ホモログの機能解析を行ったところ、CL を基質として MaSL を生成した。すなわち、基部陸植物においても SL 生合成経路が保存されており、CL から MaSL への変換が CYP711A のオリジナルな機能であることが示唆された。

Strigolactones (SLs), a class of plant hormones, act as signaling molecules for arbuscular mycorrhizal (AM) fungi in the rhizosphere. More than 30 SLs have been identified in various seed plants. To reveal the origin of SL biosynthesis, we investigated the biosynthetic pathway of SL in liverwort *Marchantia*. We extracted the rhizoid exudates from some AM-symbiosis-forming *Marchantia* spp. and tested for the SL activity using a parasitic seed germination assay. As the result, we found strong SL activity in HPLC fractions that are different from known SL-eluting fractions and finally succeeded in identifying a novel SL (MaSL). In addition, we clarified that a MAX1 (CYP711A) homolog conserved in *Marchantia* spp. produces MaSL from the SL precursor carlactone. This finding suggests that the conversion of carlactone into MaSL is the original function of CYP711A in land plants.

Strigolactone, Biosynthesis, Bryophytes

講演番号：2G06-05
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 13:00～ ミーティングルーム G

根寄生植物ヤセウツボの発芽に及ぼすトリプトファン関連分子の作用について

Tryptophan-related molecules affect germination of the root parasitic plant *Orobanche minor*

○来馬 道生、鈴木 泰輝、瀬戸 義哉 (明治大農)
○Michio KURUMA, Taiki SUZUKI, Yoshiya SETO (Meiji Univ.)

ハマウツボ科のストライガに代表する根寄生植物はアフリカなどの地域で甚大な農業被害をもたらしており、その被害額は年間 1000 億円以上と言われている。根寄生植物は宿主の根から放出されるストリゴラクトン（SL）を認識して発芽するが、5 日以内に寄生できなければ、枯死することが知られている。この作用を利用し、宿主植物非存在下で、根寄生植物を強制的に発芽させ枯死に至らせる自殺発芽誘導法が考案されている。しかし、この方法の実施に必要な SL 分子を供給することが困難であることもあり、実用化には至っていない。

私たちは、植物病原菌が二次代謝産物として植物ホルモン分子を生産することから、SL でも同様の可能性があると考え、SL 様分子を生産する微生物を探索している。その研究過程で、微生物の培地成分として良く用いられるトリプトンが、根寄生植物のヤセウツボ（*Orobanche minor*）種子発芽を阻害することを見出した。続いて、阻害物質を同定するため、培地成分を逆相 HPLC で分画した結果、$_{L}$-Tryptophan（$_{L}$-Trp）を活性分子として単離・同定した。この結果は、種々のアミノ酸がヤセウツボ種子の発芽や幼根生長に及ぼす影響を調査した報告における一部の結果と一致する内容であった（Fernández-Aparicio *et al. Front Plant Sci.* 2017）。また、市販で入手可能な Trp 類縁体を用意し、構造活性相関を調べたところ、5-OH-$_{L}$-Trp や Trp を前駆体とする植物ホルモンである Indole-3-acetic acid では強い阻害活性を示した一方で、$_{D}$-Trp やエステル体では阻害活性を示さなかった。

Parasitic weeds such as Striga, which we call witchweed, infect grain crops such as maize and sorghum, and causes annual yield losses of over a billion US dollars in sub-Saharan Africa. They require strigolactones (SLs) which are exudated from the host root for germination. However, if they fail to parasitize within five days after the germination, they cannot survive. Researchers have developed chemicals that can induce suicidal germination in the absence of a host. However, quantitative preparation of the SL molecules would be a bottleneck, that prevent a practical use of this method.

It is well known that some plant pathogenic microorganisms produce phytohormones as secondary metabolites. Thus, we are exploring microorganisms that can produce SL-like molecules. During this process, we noticed that a major microbial medium component, trypton, has an inhibitory effect on the germination of a parasitic plant, *Orobanche minor*. Subsequently, We isolated and identified $_{L}$-tryptophan ($_{L}$-Trp) as an active compound. We further tested some Trp-related chemicals, and found some chemicals showed stronger effect compared to $_{L}$-Trp.

parasitic plants, tryptophan, strigolactone

発表責任者：瀬戸義哉（yoshiya@meiji.ac.jp）

講演番号：2G06-06
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 13:00～ ミーティングルーム G

ゴール形成ハバチにおけるインドール酢酸生合成に関わる芳香族アルデヒド合成酵素の解析

Analysis of an aromatic aldehyde synthase involved in IAA biosynthesis in galling sawfly.

○宮田 海、武井 麻美、鈴木 義人（茨大・農）
○Umi MIYATA, Mami TAKEI, Yoshihito SUZUKI (Ibaraki Univ.)

ゴール形成ハバチ（*Pontania* sp.）にはインドール-3-酢酸（IAA）が高レベルで含まれており，ゴール形成との関連性が考えられる。我々はこれまでに、昆虫ではトリプトファン（Trp）からインドールアセトアルデヒド（IAAld）を経て IAA が生合成されることを明らかにし，また IAAld→IAA の変換酵素として aldehyde oxidase をカイコから同定した。

一部の植物で Trp→IAAld の変換を aromatic aldehyde synthase（AAS）が触媒することから，昆虫の遺伝子情報に基づく AAS の機能解析を行った。ハバチの AAS 相同遺伝子である PonAAS1，2，3 と，ゴール非形成昆虫であるカイコの AAS 相同遺伝子である Bm1，2，3 を対象に，大腸菌によるタンパク質合成を行い活性を調べたところ，PonAAS2 のみに変換活性が確認された。本酵素を His-tag カラムによるアフィニティー精製を行い，反応速度論解析を行ったところ，Trp に対して，$Vmax=1.6\times10^{-5}$(M/min),$Km=9.7\times10^{-5}$(M),kcat/Km=5.3 という値が得られた。本酵素は芳香族アミノ酸であるフェニルアラニン（Phe）に対しても変換活性を示し，フェニルアセトアルデヒド（PAAld）を生成した。Phe に対しては，$Vmax=6.0\times10^{-6}$(M/min),$Km=2.0\times10^{-2}$(M),kcat/Km=2.1 であり，Phe よりも Trp に対して高い触媒効率を示した。一方，バリンに対しては変換活性を示さなかった。

Galling sawfly (*Pontania* sp.) contains indole-3-acetic acid (IAA) at high concentration, suggesting the involvement of IAA in gall induction and/or maintenance. We have previously determined the biosynthetic pathway of IAA in insects to be Trp→IAAld→IAA. Since aromatic aldehyde synthase (AAS) has been shown to catalyze the conversion of Trp to IAAld in some plant species, we examined the possibility that AASs are responsible for the conversion in insects by means of heterologous expression in *E. coli*. Of several AAS homologs of galling sawfly and non-galling silkworm, only PonAAS2, an AAS from sawfly, showed conversion activity. The enzyme also converted phenylalanine to its corresponding aldehyde. The kinetic analysis indicated that the enzyme has higher catalytic efficiency to Trp than to Phe. On the other hand, Val did not work as a substrate.

gall, auxin

発表責任者：鈴木義人（yoshihito.suzuki.chemeco@vc.ibaraki.ac.jp）

講演番号：2G06-07
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 13:00～ ミーティングルーム G

藍藻の新規強光応答機構を担う Na^+/H^+ アンチポーターの同定と機能解析

Identification and functional analysis of the Na^+/H^+ antiporter responsible for a novel strong light response mechanism in cyanobacteria

○小林 歩夢[1]、辻井 雅[1]、狩野 文香[1]、解良 康太[1]、児島 征司[2]、小口 理一[3]、彦坂 幸毅[2]、園池 公毅[4]、魚住 信之[1] ([1]東北大院・工、[2]東北大院・生命、[3]東大院・理、[4]早稲田大学・教育科学学術院)

○Ayumu KOBAYASHI[1], Masaru TSUJII[1], Ayaka KANO[1], Kouta KERA[1], Seiji KOJIMA[2], Riichi OGUCHI[3], Kouki HIKOSAKA[2], Kintake SONOIKE[4], Nobuyuki UOZUMI[1] ([1]Tohoku Univ. Eng., [2]Tohoku Univ. Life Sci., [3]Tokyo Univ. Sci., [4]Waseda Univ. Edu.)

【背景】高等植物や、その葉緑体の起源となったと考えられる藍藻は得られる光量に応じて、細胞内のイオン環境を適切に調節することで生存を維持する。光合成電子伝達では、チラコイド膜を介したプロトン濃度勾配が形成され、化学エネルギーが産生されるため、H^+ 濃度の調節が光合成制御機構に関与しているが、その全貌は明らかとなっていない。藍藻 (*Synechocystis* sp. PCC 6803) には 6 つの Na^+/H^+ アンチポーター (NhaS1~NhaS6) があり、これらの光環境応答への寄与は明らかとなっていない。本研究では、強光応答に関与する NhaS の同定とその役割の解明をめざした。

【手法と結果】各欠損株 (Δ*nhaS1*~Δ*nhaS6*) の作製を行い、様々な光条件における生育試験を行った。その結果、Δ*nhaS1* と Δ*nhaS2* の各欠損株において強光感受性が上昇した。NhaS1 と NhaS2 による細胞質 pH への寄与を調べるため、pH 依存的に蛍光が変化する SynpHGFP を各株に導入し、細胞質 pH の測定を行った。その結果、Δ*nhaS1* と Δ*nhaS2* は野生株と比較して細胞質 pH が高いことを明らかにした。さらに、強光応答性遺伝子の転写解析を行ったところ、Δ*nhaS1* と Δ*nhaS2* において正常な転写誘導が起きないことが示された。これらの結果から、NhaS1 と NhaS2 は細胞質 pH を調節し、遺伝子発現の制御を行うことで、強光適応に寄与していることが示唆された。

【Introduction】Since the electron transport causes proton motive force resulting in the production of ATP and NADPH, proper control of intracellular pH is thought to be the crucial step for the proper photosynthesis in plants and cyanobacteria. We have reported that six genes coding Na^+/H^+ antiporter (*nhaS1-nhaS6*) in the model cyanobacteria, *Synechocystis* sp. PCC 6803. In this study, we elucidated the role of NhaS1-NhaS6 on light photosynthesis reaction under the various light conditions.

【Methods and Results】We generated the defective strains of *nhaS1-nhaS6* (Δ*nhaS1*-Δ*nhaS6*) and conducted growth tests under the various light conditions. Δ*nhaS1* and Δ*nhaS2* showed high sensitivity to high light. To monitor the cytoplasmic pH, we introduced SynpHGFP, which is pH sensitive GFP, into wild type and deficient strains. The cytoplasmic pH of Δ*nhaS1* and Δ*nhaS2* was higher than that of the wild type strain. The expression of the genes controlled by high light were not induced sufficiently in Δ*nhaS1* and Δ*nhaS2*. These results suggested that NhaS1 and NhaS2 are involved in high light adaptation.

Ion Transporter, Photosynthesis, Stress Response

発表責任者：小林歩夢（ayumu.kobayashi.p2@dc.tohoku.ac.jp）

講演番号：2G06-08
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 13:00～ ミーティングルーム G

シロイヌナズナにおける気孔孔辺細胞の葉緑体数の解析

Analysis of guard cell chloroplast number in *Arabidopsis thaliana*

○村松 亮輔[1]、山田 真誼[1]、サンジャヤ アルビン[1]、安澤 愛[1]、吉野 彩花[1]、伊藤 竜一[2]、藤原 誠[1] ([1]上智大理工、[2]琉球大理)

○Ryohsuke Muramatsu[1], Makoto Yamada[1], Alvin Sanjaya[1], Mana Yasuzawa[1], Ayaka Yoshino[1], Ryuuichi Itoh[2], Makoto Fujiwara[1] ([1]Sophia Univ., [2]Univ. Ryukyus)

【目的】古くから気孔孔辺細胞には、葉緑体が存在することが知られている。これまで孔辺細胞の葉緑体数は、雑種や植物組織の倍数性を判定する指標として利用されてきたが、細胞内の葉緑体増殖に関する理解は進んでいなかった。本研究では、シロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)の成熟葉を用いて、野生型エコタイプ(Col, L*er*, Ws)、葉位(第 1,2 葉と第 3,4 葉)、培養条件(土と MS 寒天培地)、組織(葉柄向軸面と葉身背軸面)、葉の気孔密度に関わる *er* 変異、葉緑体分裂阻害変異(*arc6*, *arc12*)、ストロマ局在性蛍光タンパク質の発現、以上の 7 つの項目の影響に関して、孔辺細胞の葉緑体数の比較解析を行った。

【結果と考察】いずれも 3 枚以上の葉を用いて、100 気孔(200 孔辺細胞)の葉緑体数を蛍光顕微鏡法により調べた。その結果、葉位、培養条件、*er* 変異の有無、ストロマ局在性蛍光タンパク質の蓄積にかかわらず、一孔辺細胞あたりの葉緑体数は基本的にほぼ同数であることが分かった。しかし組織については、調査したすべてのサンプルで、葉身背軸面よりも葉柄向軸面の方が孔辺細胞の葉緑体数は多かった。葉緑体分裂阻害変異は、どのサンプルでも葉緑体数の著しい減少を引き起こした。野生型エコタイプ間で葉緑体数を比較すると、ほとんどの条件で L*er* > Col, Ws の順になる傾向があった。葉肉細胞での葉緑体数は、L*er* > Col, Ws が一般的であり、葉肉細胞と気孔孔辺細胞における葉緑体数の関係性が保存されていた。

Stomatal guard cells (GCs) in the plant shoot epidermis generally contain several to tens of chloroplasts per cell. Thus far, chloroplast number at the stomatal (GC pair) level has generally been used as a convenient marker for identifying hybrid species or estimating the ploidy level of a given plant tissue. Here, we report that *Arabidopsis thaliana* leaf GCs represent a useful system for investigating the unexploited aspects of chloroplast number control in plant cells. We counted and compared the GC chloroplast number per cell using different leaf samples with regard to the *Arabidopsis* wild-type ecotype, leaf position, plant cultivation condition, *er* mutation, chloroplast division mutation, and expression of stroma-targeted fluorescent proteins. Except for the samples of chloroplast division mutants, chloroplast number in leaf GCs was highly stable between equivalent tissues. Based on these data, we will discuss the determination of GC chloroplast number in *Arabidopsis* leaves.

Arabidopsis thaliana, guard cell, chloroplast

発表責任者：藤原　誠（mtf1@mac.com）

講演番号：2G06-09
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 13:00～ ミーティングルーム G

アミノ酸代謝酵素の遺伝的な欠損によるイネの種子成分の変化

Changes of rice grain nutrient in mutant lines for amino acid metabolism

○小島 創一（東北大農）
○Soichi KOJIMA (Tohoku Univ.)

米は日本で最も消費される穀類であるのみならず、世界三大穀物の一つとして世界の人々の生活を支えている。それゆえに、米の食品としての機能性を向上させることは大きなインパクトがある。米は主要な炭水化物であり、他の食品と比較すると消費する量が多い。それゆえに米の栄養的な価値の向上はヒトの健康に大きな影響力を持つ。本研究では、アミノ酸代謝に着目する。これまでにイネのアミノ酸代謝酵素の研究に取り組んできて、その変異体系統を多数有している。その中には、グルタミン酸合成に関わるもの（Tamura et al. 2010 and 2011)、グルタミン合成に関わるもの（Funayama et al. 2013)、アスパラギン合成に関わるもの（Ohashi et al. 2015）がある。これらのアミノ酸代謝に関わる酵素のうち、グルタミン酸合成に関わる酵素の機能欠損は種子のアミノ酸とタンパク質量を劇的に増加させた(Imagawa et al. 2018)。本研究は、他のアミノ酸代謝酵素にも着目して、変異体系統群の種子におけるタンパク質量とアミノ酸組成を詳しく調べた。

Rice is one of the most important crop plants because it sustains world population. There is a huge potential demand for improving the nutritional quality of rice grains, since the consumption of rice is relatively higher than that of other food. It could serve as not only carbohydrate source but also other nutrition source, e.g. protein. My research group has been engaged in studying amino acid metabolism in rice. Reverse genetic studies revealed the contributions of genes related to amino acid metabolism to rice growth and yield. They are NADH-dependent glutamate synthase 1 (*NADH-GOGAT1*, Tamura et al. 2010), NADH-dependent glutamate synthase 2 (*NADH-GOGAT2*, Tamura et al. 2011), glutamine synthetase 1;2 (*GS1;2*, Funayama et al. 2013), and asparagine synthetase 1 (*AS1*, Ohashi et al. 2015). Among them, grains of *nadh-gogat1* and *nadh-gogat2* accumulated higher protein and amino acids (Imagawa et al. 2018). Amino acid and protein in other mutants are discussed in this presentation.

rice, grain protein content, GS/GOGAT

発表責任者：小島創一（soichi.kojima.a2@tohoku.ac.jp）

講演番号：2G06-10
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 13:00～ ミーティングルーム G

カプサイシン生合成における推定アミノトランスフェラーゼ、カプサイシンシンターゼの関与
Involvement of putative aminotransferase and capsaicin synthase in capsaicin biosynthesis

○中里 彩夏[1]、金島 一樹[1]、三澤 悠貴[1]、佐野 香織[1]、中谷 祥恵[1]、田中 義行[2]、古旗 賢二[1]([1]城西大、[2]京都大)
○Saika NAKASATO[1], Itsuki KANESHIMA[1], Yuki MISAWA[1], Kaori SANO[1], Sachie NAKATANI[1], Yoshiyuki TANAKA[2], Kenji KOBATA[1] ([1]Josai Univ., [2]Kyoto Univ.)

【Background＆Purpose】Capsaicin (CAP), a pungent ingredient of *Capsicum*, is expected to be used in functional foods as an ingredient having an effect of suppressing body fat accumulation. CAP is synthesized in the placenta of *Capsicum* fruits, and its biosynthetic pathway is considered as follows. Putative aminotransferase (pAMT) converts vanillin (V) to vanillylamine (VNH□), and capsaicin synthase (CS) encoded by the Pun1 gene dehydrates and condenses VNH□ and fatty acids to CAP. However, there is no research report on the purification and use of pAMT and Pun1 from *Capsicum*, and it has not been directly proven that these enzymes are involved in CAP biosynthesis. Therefore, with the aim of clarifying whether these are involved in the CAP biosynthesis reaction, we prepared recombinant pAMT (rpAMT) and Pun1 (rPun1) using *Escherichia coli* and examined their activity.

【Methods】A plasmid incorporating the pAMT gene or the Pun1 gene cloned from the placenta of *Capsicum* with His tag was transformed into *Escherichia coli* BL21(DE3). Gene expression was induced by adding 1M IPTG, and the protein was synthesized overnight at 15℃. RpAMT and rPun1 were purified by Ni column. For rpAMT activity, V was added as a substrate, γ-aminobutyric acid was added as an amino group donor, and pyridoxal phosphate was added as a coenzyme, and after incubation at 30℃, the amount of VNH□ produced was measured by HPLC. For rPun1 activity, VNH□ and fatty acid CoA were added, incubated at 30℃, and the amount of CAP produced was measured by HPLC.

【Results】We were able to obtain rpAMT as a single band on SDS-PAGE. This rpAMT showed synthetic activity from V to VNH□. In the Ni column eluted fraction, rPun1 showed a synthetic activity of CAP analog from VNH□, although no band was confirmed by CBB staining. From the above, it was possible to directly show that pAMT is responsible for the synthesis of V to VNH□, and Pun1 is responsible for the synthesis of VNH□ to CAP in the CAP biosynthesis of *Capsicum*.

Capsicum, putative aminotransferase, capsaicin synthase

発表責任者：古旗 賢二（kobata@josai.ac.jp）

講演番号：2G06-11
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 13:00～ ミーティングルーム G

カプサイシン生合成における推定アミノトランスフェラーゼの関与

Involvement of putativ aminotransferase in capsicin biosynthesis

○三澤 悠貴、中里 彩夏、佐野 香織、中谷 祥恵、古旗 賢二 (城西大学)
○Yuki MISAWA, Saika NAKASATO, Kaori SANO, Sachie NAKTANI, Kenji KOBATA (Josai Univ)

【Summary】
Capsaicin (CAP) is a spicy ingredient peculiar to *Capsicum* of Solanaceae. The biosynthetic pathway of CAP includes the synthesis of vanillin (V) to vanillylamine (VNH_2), and this conversion is presumed to be catalyzed by putative aminotransferase (pAMT). The purpose of this research was to elucidate the involvement of pAMT in the conversion by evaluating the activity and characteristic of recombinant protein of pAMT.

【Method】
A plasmid in which both the pAMT gene cloned from the placenta of *Capsicum* and His tag were incorporated was transformed into *E.coli* BL (DE3). Gene expression was induced by adding 1 M IPTG, and the protein was synthesized overnight at 15℃. Recombinant pAMT (rpAMT) was purified from the recovered *E.coli* on a Ni column. To the rpAMT activity, V was added as a substrate, γ-aminobutyric acid (GABA) was added as an amino group donor, and pyridoxal phosphate (PLP) was added as a coenzyme, and the amount of VNH_2 produced was measured by HPLC after incubation at 30℃. The optimum pH, optimum temperature, type of amino donor, and reverse reaction, that is, conversion of from VNH_2 to V were performed to evaluate the characteristics of the protein.

【Results / Discussion】
rpAMT obtained using Escherichia coli showed a synthetic activity from V to VNH_2. The optimum pH was pH 8 and the optimum temperature was 40℃. Amino donors showed high values when GABA and alanine were used. The reverse reaction from VNH_2 to V has a faster reaction rate than that from V to VNH_2. We believe that it was possible to prove that pAMT is directly involved in the synthesis of V to VNH_2.

Capsaicin, putative aminotransfearse, vanillylamin

発表責任者：古旗賢二（kobata@josai.ac.jp）

講演番号：2G06-12
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 13:00～ ミーティングルーム G

生薬植物カラスビシャクのアラバン生合成酵素遺伝子の探索

Search of a gene for Araban biosynthesis from a medicinal plant *Pinellia ternata*

○青木 達大[1]、下川 響[1]、江口 壽彦[2]、松岡 健[1,2,3] ([1]九大院生資環、[2]九大生環セ、[3]九大院農)
○Tatsuhiro AOKI[1], Hibiki SHIMOKAWA[1], Toshihiko EGUCHI[2], Ken MATSUOKA[1,2,3] ([1]Kyushu Univ., Grad. Sch. Bio-Environ. Sci., [2]Kyushu Univ., Biotron Appl. Ctr., [3]Kyushu Univ., Fac. Agr.)

カラスビシャクの塊茎を加工した半夏はほぼ 23%の漢方処方に用いられる重要な生薬である。半夏は制吐性を有する多糖アラバンを有効成分として持つ。我々は、アラバンの生合成遺伝子の同定を目指した研究を進めており、この過程において、アラバン生合成遺伝子候補の異種発現や、発現抑制を行う実験が必須である。そのため我々は、アラバン生合成酵素遺伝子候補の探索を行っている。

カラスビシャク塊茎に含まれるアラバンは、β-1, 3-ガラクトース構造を持つ。そこで雲南農業大学の公開した塊茎 RNAseq のデータを対象にシロイヌナズナの β-1, 3-ガラクトシルトランスフェラーゼのアミノ酸配列情報を用いて、これと高い相同性を持つタンパク質をコードする遺伝子断片を検索したところ、そのような配列が存在することを見出した。そこで該当する RNAseq の配列データを繋ぎ合わせ、この糖転移酵素の cDNA 配列をアセンブルした。次いで、現在我々が栽培中のカラスビシャクの塊茎から調製した cDNA ライブラリーから、この糖転移酵素候補に対する cDNA を単離し、その塩基配列を決定後、コードされるタンパク質の推定アミノ酸配列を決定した。633 残基からなるこの配列を用いて膜貫通領域の検索を行った結果、この糖転移酵素候補は N 末端を細胞質側に持つⅡ型の膜貫通蛋白質であると推定された。これに加えて DXD モチーフを有することからも、この遺伝子はゴルジ体に存在する糖転移酵素をコードすることが示唆された。

現在、この糖転移酵素候補と GFP 融合タンパク質をタバコ BY-2 細胞で発現させることで、この酵素がゴルジ体に存在するか検討を進めている。

The dried rhizome of *P. ternata,* which is called “Hange” in Japanese, is widely used for the traditional medicine in East Asia. A major functional constituent of Hange, showing anti-emetic effect, is called Araban, an arabinose-rich glycan.

It has been reported that Araban contain β-linked 1,3-galactose structure. Gene fragments was searched from a *P. ternata* RNA seq data using *Arabidopsis thaliana* β-1,3-galactosyltransferase cDNA sequence as a query. Thereafter cDNA sequence for the possible glycosyltransferase was assembled using the identified sequences. Then, the corresponding cDNA was cloned from a cDNA library prepared from the rhizome of *P. ternata*. The encoding protein, consisted with 633 amino acid residues with a DXD motif, was predicted as a type II transmembrane protein.

Pinellia ternata, araban, heterologous expression

講演番号：2G06-13
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 13:00～ ミーティングルーム G

Production of recombinant β-glucocerebrosidase enzyme in glycoengineered *Nicotiana benthamiana* root culture

○Naphatsamon UTHAILAK[1,2], Hiroyuki KAJIURA[1,2], Ryo MISAKI[1,2], Kazuhito FUJIYAMA[1,2]
([1]Osaka Univ., [2]ICBiotech.)

[Objective]: Gaucher disease is caused by insufficient functional β-glucocerebrosidase (GCase), a lysosomal enzyme. Recombinant GCase has been used in enzyme replacement therapy for the effective treatment of Gaucher disease type I. Although commercial GCase have been produced in both mammalian cells and carrot-suspension culture, there are safety issues associated with each system. Mammalian cell cultures can be contaminated by human pathogen, while GCase produced in carrot cells contain plant-specific glycans, which pose immunogenicity issues. In this research, recombinant GCase was produced in root cultures induced from glycoengineered *Nicotiana benthamiana*. This root culture system has advantages on pharmaceutical protein production as there is no risk of contamination by human pathogens and it produces protein with low plant-specific glycans. Therefore, our research aimed to produce the active recombinant GCase in glycoengineered *N. benthamiana* root culture with low plant-specific glycans.

[Method]: Seeds of glycoengineered GCase-producing plants were sterilized and selected by antibiotics. Seedlings were screened using anti-GCase and anti-Horseradish peroxidase (HRP) blotting. Target plants were grown in sterilized pots for 1 month. Five root culture lines were induced in liquid medium by plant hormones. Recombinant GCase was analyzed using GCase activity assay, CBB staining and Western blot (Anti-GCase and Anti-HRP antibodies).

[Results]: Functional GCase was successfully produced from glycoengineered root culture with the enzyme activity 52.3 ± 2.2 Units/mg total protein at week 3 after root induction. Recombinant GCase produced from glycoengineered root culture was expected to contain low plant-specific glycans as evidenced by anti-HRP blotting compared to wild-type root culture. Our research provides an alternative system for pharmaceutical protein production in plants. This system might be applied for other recombinant proteins production in the future.

Root culture, Plant-made pharmaceuticals, Glucocerebrosidase

発表責任者：FUJIYAMA Kazuhito（fujiyama@icb.osaka-u.ac.jp）

講演番号：2H02-01
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 09:30～ ミーティングルーム H

尾上菜が示す自家不和合性の機構解析

Mechanism of self-incompatibility in Onoena

○池田 直樹[1]、中島 遼太[1]、尾西 晃一[2]、小倉 淳[1,2]、蔡 晃植[1,2,3]([1]長浜バイオ大院・バイオ、[2]長浜バイオ大・バイオ、[3]長浜バイオ大・ゲノム編集研究所)
○ Naoki IKEDA[1], Ryouta Nakajima[1], Kouiti Onishi[2], Atsushi Ogura[1,2], Fang-sik Che[1,2,3] ([1]Graduate School of Bioscience, Nagahama Institute of Bio-Science and Technology, [2]Bio-science, Nagahama Institute of Bio-Science and Technology, [3]Genome Editing Research Institute, Nagahama Institute of Bio-Science and Technology)

滋賀県長浜市の尾上地区で古くから栽培されてきた尾上菜の分子レベルでの知見を得るため、まず、尾上菜の全ゲノム配列解析を行った。尾上菜から得られた DNA を次世代シーケンサーで解析したところ、尾上菜の全ゲノムは 423Mbp で構成されており、68,408 個の遺伝子を含むことが明らかになった。また、Rubisco 大サブユニットと 18S rRNA の ITS2 領域を基にした相同性配列解析と染色体解析によって、尾上菜は *Brassica rapa* であることも確認された。興味深いことに、尾上菜のゲノムにはアブラナ科の自家不和合性を制御する *S* 遺伝子座と思われる領域が存在していたので、尾上菜各個体間での受粉試験を行ったところ、自家受粉では種子が得られなかったことから、尾上菜は自家不和合性を示すことが明らかになった。そこで、各株の *S* 遺伝子型を同定するため、尾上菜 8 株を用いた交配実験を行った結果、8 株の尾上菜から 14 種の *S* 遺伝子型を同定することができた。アブラナ科の自家不和合性は、*S* 遺伝子座に存在する花粉側因子 *S-locus protein 11*(*SP11*)と雌蕊側因子 *S-receptor kinase*(*SRK*)の配列多様性により制御されていることが知られているので、次に交配実験に用いた各株の柱頭から RNA を抽出して cDNA を合成した後、各株の *SRK* の配列解析を行った。その結果、尾上菜の *SRK* はシグナルペプチド、*S* ドメイン、膜貫通ドメイン、セリンスレオニンキナーゼドメインで構成されており、特に各 *S* ドメイン間では 70%～90%程度の配列相同性が存在することが示された。さらに、*SP11* についても葯から得た RNA を鋳型として作成した cDNA とゲノム DNA を用いて配列解析を行ったところ、各遺伝型特異的な配列が認められたことから、尾上菜の自家不和合性は *SP11* と *SRK* の配列多様性により制御されていることが明らかとなった。

To obtain knowledge at the molecular level of Onoena, whole genome sequence of Onoena was performed. Onoena genome is composed of 423Mbp and contains 68,408 genes. The homology analysis of Rubisco large subunit gene and ITS2 region of 18S rRNA showed that Onoena belongs to the *Brassica rapa*. Pollination experiments were performed because the *S* locus that regulates self-incompatibility was present in the Onoena genome. Since self-incompatibility of Onoena was confirmed by the pollination, the sequences of pistil factor *SRK* and pollen factor *SP11* were analyzed from each haplotype. About 70 to 90% of sequences identity was observed between SRKs of each haplotype, and between SP11s of each haplotype. These results indicate that the self-incompatibility of Onoena is regulated by the sequence diversity of *SP11* and *SRK*.

self-incompatibility

講演番号：2H02-02
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 09:30～ ミーティングルーム H

ゲノム編集技術の食品利用におけるオフターゲット予測と解析スキームの確立

Establishment of off-target prediction/detection scheme in genome-edited food

○成島 純平[1]、中村 公亮[1]、木俣 真弥[1]、志波 優[2]、秋本 智[1]、曽我 慶介[1]、吉場 聡子[1]、権藤 崇裕[3]、明石 良[3]、柴田 識人[1]、近藤 一成[1] ([1]国立衛研、[2]東京農大、[3]宮崎大)
○ Jumpei NARUSHIMA[1], Kosuke NAKAMURA[1], Shinya KIMATA[1], Yuh SHIWA[2], Satoru AKIMOTO[1], Keisuke SOGA[1], Satoko YOSHIBA[1], Takahiro GONDO[3], Ryo AKASHI[3], Norihito SHIBATA[1], Kazunari KONDO[1] ([1]NIHS, [2]Tokyo Univ. Agric., [3]Univ. Miyazaki)

我が国においてゲノム編集食品の届出制度が開始された。ゲノム編集技術の食品利用においては意図せぬ切断（オフターゲット切断）による新規タンパク質等の発現が懸念されているが、現状では明確なオフターゲット解析スキームは存在しない。ゲノム編集研究ではコンピューターでのオフターゲット予測が汎用されるが、オフターゲット箇所が網羅されているか不明である。本研究では、抽出 DNA を *in vitro* で RNP（ガイド RNA-Cas9 タンパク質複合体）により切断し、切断されたカットサイトを NGS で網羅的に検出する SITE-Seq 法を用いてオフターゲット予測を行った。さらにその結果を既存のコンピューター予測プログラムと比較し、SITE-Seq 法の有効性について検証を行った。

日本晴イネゲノムを用いた SITE-Seq 法により検出されたカットサイトのうち、アノテーションされた領域内にあり、かつ複数の RNP 濃度で共通して検出されたカットサイトが 9 か所（オンターゲット含む）あった。この 9 か所について、実際にゲノム編集を行ったイネカルスから抽出した DNA を用いてアンプリコンシークエンスを行った結果、オンターゲット及び一部のオフターゲットで変異が確認された。変異のあったオフターゲットは、一般的には考慮されない PAM 配列である NTG を有しており、既存のコンピューター予測ツールでは CRISPRdirect 以外では予測することができなかった。このことから、SpCas9 を用いる際には NGG や NAG の他に、NTG PAM を有するカットサイトについても考慮する必要性が示唆された。SITE-Seq 法は PAM 配列に関係なくカットサイトを検出でき、コンピューター予測よりも実態に則したオフターゲット予測に有効であると考えられる。

The notification system for genome-edited foods has started in Japan. Discovering off-target site is essential for safety use in genome editing tools, but there was no standard scheme. SITE-Seq is a target genome sequencing which comprehensively detects Cas9 cut sites. We performed SITE-Seq using rice genomic DNA and verified the efficiency of SITE-Seq to compare with computational off-target prediction programs.

SITE-Seq shows 9 cut sites (including on-target) which were annotated and duplicately detected at several concentrations of RNP (gRNA-Cas9 complex) treatment. The Amplicon-seq using genome-edited rice genomic DNA revealed on-target site and one off-target site containing a NTG PAM. These data suggest that NTG PAM should be considered as candidate loci in using SpCas9. SITE-Seq could provide the highly potential sites digested by Cas9 in actual, and that SITE-Seq may be effective to predict off-target sites in genome editing.

CRISPR-Cas9, Off-target detection, NGS

発表責任者：近藤一成（kondo@nihs.go.jp）

講演番号：2H02-03
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 09:30～ ミーティングルーム H

The design of the inserted oligo ends for the precision genome editing by the microhomology-mediated end joining (MMEJ) repair of the genome of tomato protoplast

○Jin MURAOKA[1], Ellen SLAMAN[2], Michiel LAMMERS[2], Ruud A. DE MAAGD[2], Gerco C. ANGENENT[2] ([1]Panasonic Corp., [2]Wageningen University & Research)

遺伝子の挿入（ノックイン）といった遺伝子編集を正確に制御することは、バイオ技術の最終的なゴールである。CRISPR/Cas システムは生物のゲノム編集を簡単に行え、特に高等生物に対しては効率的なツールである。しかしながら、本システムは主にノックアウトが基本戦略であり、ゲノム上から重要遺伝子を削除し関与する機能を特化させるものである。

現在も正確なノックインゲノム編集は様々なアプローチでされており、例えば、部位特異的突然変異誘発 (ODM)、相同組み換え (HR) による編集などがあるが中でも、HR による編集はよく利用される。一方で、商業応用するにはさらなる高精度、高効率なノックイン法が求められる。

そこで私たちは、非相同末端結合（MMEJ）を利用したゲノム編集に焦点をあて、トマトのプロトプラストを用いて、ゲノムへ挿入する遺伝子断片の末端を設計の効果を調査した結果、ノックイン効率が向上する設計を見出した。本結果は、今後の植物体の効率的な改変に有用であると考えられる。

Precise and controlled allele introgression or gene knock-in are the ultimate goals of plant breeding, which may be achieved through the use of gene-editing. The CRISPR/Cas system is often used for the effective genome editing in eukaryotes. However, the main use of the system in plants is to knock-out genes through mutagenesis, for functional characterization of those genes. Precise genome editing has been developed through various approaches, e.g. oligonucleotide-directed mutagenesis (ODM), homology-directed repair (HDR)-based gene targeting, base editing and prime editing. With the CRISPR/Cas system, HDR-mediated precise editing in plants occurs at very low frequencies. For commercially viable applications of precise genome editing further research needs to be performed to make the knock-in efficiency higher and precise enough.

We therefore focused on the precision genome editing mediated by microhomology-mediated end joining (MMEJ) in this study, and discussed how the design of the inserted oligo ends affect the MMEJ repair of the genome of tomato protoplasts. We show several designs of the inserted oligo and found one that made the knock-in efficiency high enough. The results could be useful to develop the high-efficiency knock-in methods for the modification of plants by the CRISPR/Cas system.

Genome Editing, knock-in, MMEJ

発表責任者：村岡　仁（muraoka.jin@jp.panasonic.com）

講演番号：2H02-04
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 09:30～ ミーティングルーム H

イネにおけるカルス形成制御遺伝子の探索と解析

The exploration and analysis of genes regulating callus formation in rice

○西尾 陸[1]、春名 沙紀[1]、沼本 穂[1]、森田 重人[1,2]、増村 威宏[1,2]([1]京都府立大学・生命環境、[2]京都府農技セ・生資セ)
○ Riku NISHIO[1], Saki HARUNA[1], Minori NUMAMOTO[1], Shigeto MORITA[1,2], Takehiro MASUMURA[1,2] ([1]Kyoto Pref. Univ. Life Env. Sci., [2]Kyoto Prefect. Agri. Forest. Fish. Technol. Cent., Biotechnol. Res. Dept.)

【背景と目的】
イネ（*Oryza Sativa*）は日本の主要作物であり、ゲノム編集などを用いた分子生物学的研究が盛んに行われている。現在、効率的なゲノム編集のために Cas9 タンパク質を直接導入する研究が植物においても進められている。イネにおいてプロトプラストを用いた直接導入法は細胞増殖・再分化効率を改善する必要があると考えられており、本研究では細胞増殖・カルス形成を制御する遺伝子について探索を行った。
【方法と結果】
シロイヌナズナ（*Arabidopsis thaliana*）で明らかにされたカルス形成誘導遺伝子のイネオーソログを候補とし、イネのカルスと芽生えにおける発現解析を qRT-PCR 法で行った。候補遺伝子中の複数の遺伝子が、芽生えに比べてカルスで強く発現しており、*OsLOB16* は 100 倍、*OsPLT6* は 27 倍、*OsPLT2* は 19 倍と顕著な発現差が観察された。これらの遺伝子はカルス誘導開始後 1 週間で発現のピークを迎え、誘導後 1 ヶ月にかけて次第に発現量が低下した。これらの遺伝子はオーキシン応答、幹細胞維持などに働くと考えられていたが、本研究によりカルス形成においても重要な役割を果たしていることが示唆された。今後、各遺伝子の下流にある遺伝子についても解析を進め、細胞増殖・再分化に対する有効性を評価し、再分化を促進する手法の開発を目指す。

Rice (*Oryza Sativa*) is a major crop, and that molecular biological research is being actively conducted in Japan. In plants, genome editing research is underway to directly introduce the Cas9 protein for more efficiently. The direct introduction method using protoplasts is important theme in rice. In this study, we searched some genes that control in callus formation in order to improve the cell proliferation and regeneration efficiency.
We carried qRT-PCR to analyze rice orthologs of the callus formation gene in *Arabidopsis thaliana*. Several genes (*OsLOB16, OsPLT6, OsPLT2,* etc.) were strongly expressed in callus compared to seedlings. These genes were thought to play important role in auxin response and stem cell maintenance. Our study suggested that these genes are important role in callus formation.

rice, callus, transcription factor

発表責任者：増村　威宏（masumura@kpu.ac.jp）

講演番号：2H02-05
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 09:30～ ミーティングルーム H

マルチオミクス解析によるシロイヌナズナ種内雑種におけるバイオマス増加メカニズムの解析
Integrated transcript and metabolite profiling reveals coordination between biomass and nitrogen metabolism in Arabidopsis F_1 hybrids

○杉 直也[1]、レ ティ ノ クイン[1]、小林 誠[2]、草野 都[1,2]、柴 博史[1] ([1]筑波大院・生命環境、[2]理研・CSRS)
○Naoya Sugi[1], Quynh Le Thi Ngoc[1], Makoto Kobayashi[2], Miyako Kusano[1,2], Hiroshi Shiba[1] ([1]Univ. of Tsukuba, [2]RIKEN CSRS)

雑種強勢は、異なる種間あるいは種内系統間の交配で得られた F_1 雑種において、その両親と比較してバイオマスの増大、ストレス耐性向上等により旺盛な生育を示す現象である。当該現象は農業分野においても重要であることから盛んに研究されているが、未だ全容解明には至っていない。本研究においては、従来研究の問題点として考えられた栽培環境のばらつきを改善した植物栽培系を構築し、加えてマルチオミクス解析によって雑種強勢メカニズムへの新規知見を得ることを目的とした。まず、栽培環境要因のばらつきを極力排除し、均一化された新規バイオマス測定系を確立した。この系を用いて生育させた F_1 雑種はその両親系統と比較して有意なバイオマス増加を示し、またデータのばらつきにおいても改善を示した。これらを材料としてメタボローム解析を行った結果、237 種類の代謝産物を検出し、その中には F_1 雑種特異的な増減パターンを示す代謝物として、炭素・窒素代謝のクロストークで重要な 2-oxoglutarate も含まれていた。また、トランスクリプトーム解析の結果、F_1 雑種において有意な発現上昇を示した遺伝子を用いて GO 解析を行うと、nitrogen を含む GO タームがいくつか存在し、F_1 雑種における窒素代謝の変化が示唆された。さらに、窒素代謝に関与する遺伝子に対して定量 PCR を行なったところ、葉緑体局在型グルタミン合成酵素である *AtGLN2* の有意な発現上昇が見られた。これらの結果を元にシロイヌナズナ F_1 雑種における雑種強勢メカニズムについて考察したい。

Heterosis refers to the improved agronomic performance of F_1 hybrids relative to their parents. To dissect the metabolic fluctuations derived from genomic and/or environmental differences contributing to the improved biomass of F_1 hybrids relative to their parents, we optimized the growth condition for Arabidopsis thaliana F_1 hybrids and their parents. Modest but statistically significant increase in the biomass of F_1 hybrids was observed. Plant samples grown under the optimized condition were also utilized for integrated omics analysis to capture specific changes in the F_1 hybrids. As a result of metabolite profiling, 2-oxoglutarate showed a unique change in F_1 hybrids. In addition, microarray analysis revealed that there were 44 up-regulated genes in the F_1 hybrid. Gene ontology (GO) analyses indicated that genes up-regulated in the F_1 hybrids were largely related to organic nitrogen (N) process. Quantitative PCR verified that *glutamine synthetase 2* (*AtGLN2*) was upregulated in the F_1 hybrids. These results suggested the existence of metabolic regulation that coordinates biomass and N metabolism involving *AtGLN2* in F_1 hybrids.

Arabidopsis, heterosis, nitrogen metabolism

講演番号：2H02-06
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 09:30～ ミーティングルーム H

イネのファイトアレキシン生合成遺伝子発現における上流保存領域の機能

Functions of the upstream conserved regions of phytoalexin biosynthetic genes in rice

○茂木 郁也[1]、冨山 詩歩[1]、吉田 悠里[1]、宮本 皓司[2]、野尻 秀昭[1]、岡田 憲典[1] ([1]東京大学生物生産工学研究センター（東大生セ）、[2]帝京大学理工学部バイオサイエンス学科)
○ IKUYA MOTEGI[1], SHIHO TOMIYAMA[1], YURI YOSHIDA[1], KO MIYAMOTO[2], HIDEAKI NOJIRI[1], KAZUNORI OKADA[1] ([1]Univ. of Tokyo., [2]Teikyo Univ.)

イネ属 *Oryza* の中には、生物/非生物ストレスに応答し、抗菌性低分子化合物のジテルペン型ファイトアレキシンを生産するものがある。我々は、栽培イネ *O. sativa* や野生イネ *O. punctata* などが生産するファイトアレキシンの生合成遺伝子に着目し、モミラクトン生合成遺伝子がイネ 4 番染色体上において、ファイトカサン生合成遺伝子がイネ 2 番染色体上において、それぞれ遺伝子クラスターを形成することを報告してきた。クラスター領域に存在する生合成遺伝子群はストレス環境下で同調的な発現誘導を示し、その発現制御にはジャスモン酸(JA)応答性の bZIP 型および bHLH 型転写因子が関与することも明らかにしている。しかし、これらの転写因子がどのようにクラスター内遺伝子を同調的に制御しているのかは未解明である。本研究では、モミラクトン生合成遺伝子 *OsKSL4* およびファイトカサン生合成遺伝子 *OsCPS2* の上流に存在する JA 応答性転写因子の結合領域を、ゲノム編集で欠失させ、ファイトアレキシン生産への影響を検討した。これまでに *OsKSL4* 上流領域を欠失させた場合、野生株と比べ JA 処理後の *OsKSL4* の発現が遅れることがわかった。この領域には bZIP 転写因子の結合配列と、*O. punctata* にも高く保存される配列が含まれているので、影響を与える領域のさらなる絞り込みを進めている。現在、*OsCPS2* 上流標的領域の欠損株についても解析中であり、クラスター内の他のファイトアレキシン生合成遺伝子に対する影響についても合わせて報告する。

The genus *Oryza* is known to synthesize antimicrobial diperpenoid phytoalexins, such as phytocassanes and momilactones. Biosynthetic genes for each phytoalexin are localized as gene clusters on chromosomes 2 and 4 in the cultivated rice *O. sativa* and in certain wild rice species including *O. punctata*. We have previously reported that these genes are expressed synchronously in response to abiotic/biotic stresses and transcription factors (bZIP and bHLH) induced by jasmonic acid are involved in this response. In this study, we generated genome-edited rice plants, which lost some conserved regions upstream of *OsKSL4* and *OsCPS2* and investigated the cluster-scale transcriptional regulation of these genes. As a result, we found that *OsKSL4* expression is delayed by the deletion of its upstream region. This region contains bZIP binding motifs and sequences highly conserved in *O. punctata*, so we are narrowing down the sequence that constitutes the transcriptional regulatory region. Currently, we are investigating the possible impacts on the expression of genes neighboring *OsKSL4* and *OsCPS2* to obtain information about the synchronized expression mechanism of phytoalexins biosynthesis gene clusters.

phytoalexin, genome editing, gene cluster

講演番号：2H02-07
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 09:30～ ミーティングルーム H

植物におけるフラビン代謝制御に関与する新規転写因子の機能解析
Functional analysis of a novel transcription factor involved in the regulation of flavin metabolism in plants

○原田 美帆[1]、難波 純也[1]、丸田 隆典[1]、石川 孝博[1]、吉村 和也[2]、重岡 成[3]、小川 貴央[1]([1]島根大院・自然科学、[2]中部大・応生・食栄、[3]近畿大・附属農場)
○ Miho HARADA[1], Junya NAMBA[1], Takanori MARUTA[1], Takahiro ISHIKAWA[1], Kazuya YOSHIMURA[2], Shigeru SHIGEOKA[3], Takahisa OGAWA[1] ([1]Grad. Sch. Nat. Sci. Technol., Shimane Univ., [2]Dept. Food Nutr. Sci., Coll. Biosci. Biotech., Chubu Univ., [3]Exp. Farm, Kindai Univ.)

ビタミン B_2 (RF:リボフラビン)を前駆体とする FMN および FAD は、植物において光合成/呼吸電子伝達系や多くの二次代謝産物の生合成系に関与するため、それらの細胞内フラビン化合物レベルは厳密に制御する必要がある。しかしながら、植物におけるフラビン代謝系の調節機構についてはほとんど不明である。そこで我々は、シロイヌナズナを用いたトランスクリプトーム解析を行い、FAD 処理により発現変動する転写因子 (FAD-responsive transcription factors:FRTFs)を 47 個見出した。19 個の FRTF 遺伝子破壊株を単離し、それらの細胞内フラビン化合物レベルを解析した結果、*frtf19* においてすべてのフラビン化合物レベルが野生株より顕著に減少していた。さらに *frtf19* では、RF 合成に関与する複数の遺伝子の発現量が顕著に低下していた。一方、*FRTF19* のエストロゲン (ES)誘導型一過的過剰発現株においては、ES 処理による *FRTF19* の発現上昇にともなって、RF 合成系遺伝子群の発現と細胞内 RF レベルは顕著に増加した。また野生株において、低温およびアブシジン酸処理によって、*FRTF19* と RF 合成系遺伝子群の発現が上昇した。以上の結果より、*FRTF19* はストレス条件下における植物細胞内のフラビン代謝制御に関与していることが強く示唆された。

Riboflavin (RF) is the precursor of FMN and FAD, which are essential redox cofactors involved in many metabolic processes in plants. Thus, the intracellular flavin homeostasis must be strictly regulated. However, at present information on the regulatory factors involved in the flavin homeostasis is mostly absent. Recently, we identified 47 FAD-responsive transcription factors (FRTFs) by a microarray analysis using Arabidopsis leaves that had been treated with exogenous FAD. Among *frtf* knockout mutants, the *frtf19* plants exhibited lower intracellular flavin levels and expression of RF biosynthetic genes compared to the wild-type plants. In the wild-type plants, the expression of *FRTF19* as well as RF biosynthetic genes and intracellular flavin levels were increased by low temperature and abscisic acid treatment, suggesting that *FRTF19* is involved in the regulation of flavin metabolism in plants under stress conditions.

Transcription factor, Riboflavin, Arabidopsis thaliana

発表責任者：小川貴央（t-ogawa@life.shimane-u.ac.jp）

講演番号：2H02-08
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 09:30～ ミーティングルーム H

植物のアスコルビン酸生合成律速酵素 VTC2 の発現制御因子の同定

Identification of a factor involved in the regulation of VTC2 gene expression encoding a rate-limiting enzyme for plant ascorbate biosynthesis

熊谷 憲明[1]、宇佐見 幸太[1]、長谷川 未希[1]、渡辺 雄太[1]、石川 孝博[2]、○吉村 和也[1]([1]中部大応生、[2]島根大生資科)

Noriaki KUMAGAI[1], Kota USAMI[1], Miki HASEGAWA[1], Yuta WATANABE[1], Takahiro ISHIKAWA[2], ○Kazuya YOSHIMURA[1] ([1]Chubu Univ., [2]Shimane Univ.)

D-マンノース/L-ガラクトース経路は植物における主要な AsA 生合成経路であり、*VTC2* 遺伝子にコードされた GDP-L-ガラクトースホスホリラーゼが律速段階を触媒している。葉での *VTC2* 遺伝子の発現量および AsA 蓄積量は明期および暗期にそれぞれ増加および減少し、光強度に依存して亢進する。また、*VTC2* 遺伝子の発現は概日リズムにも制御されている。しかし、*VTC2* の発現制御機構については不明な点が多い。そこで本研究では、*VTC2* プロモーター制御下でルシフェラーゼレポーター遺伝子を発現させたシロイヌナズナ(VTC2pro::LUC)を用いた遺伝学的手法により、*VTC2* の発現制御に関わる因子の同定を試みている。

VTC2p:LUC 株の EMS 処理変異種子(M2)を長日条件下で栽培し、明暗に応答した LUC 発光の増減に異常を示すものを培養装置付全自動生物発光測定装置を用いてスクリーニングした。これまでに、約 3700 の変異株から、現在までに 14 株において LUC 発光の異常が確認できた。次世代での再現性が確認できた変異株については順次、LUC および VTC2 の発現量の経時的変化を解析しており、1-6-H12 株では明期/暗期ともにコントロール株よりも低いレベルで、3-6-B6 株では高いレベルで日周変動していることが明らかになった。水耕栽培により独立栄養条件下で 3 週間栽培した 1-6-H12 株の AsA 量を測定した結果、コントロール株より低い値を示した。現在、次世代シークエンスにより、それら変異株の変異部位の同定を試みている。

The D-mannose/L-galactose pathway is the predominant pathway for ascorbate (AsA) biosynthesis in plant leaf. The GDP-L- galactose phosphorylase encoded by the *VTC2* gene catalyzes the rate-limiting reaction in the pathway. The expression of *VTC2* as well as the intracellular AsA levels is increased by light but decreased by dark. The expression of *VTC2* is also regulated by circadian rhythm. To identify a regulatory factor for the *VTC2* expression, we are trying to isolate mutants with abnormality in the light/dark response from EMS-mutagenized Arabidopsis plants expressing the luciferase reporter gene driven by the *VTC2* promotor (VTC2p:LUC). Up to now, we isolated 14 mutants having abolished day/night response of the LUC luminescence or facilitated luminescence in daytime. The *VTC2* expression levels and the AsA levels of the 1-6-H12 mutants in daytime were lower than those in the control plants. Conversely, the 3-6-B6 mutants showed higher levels than the control plants. Now, we are trying to identify the gene responsible for the phenotype.

Ascorbate, VTC2, plant

講演番号：2H02-09
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 09:30～ ミーティングルーム H

イネの分げつ形成を制御する遺伝的機構

Genetic mechanism that regulates tiller formation in rice

○田中 若奈[1]、平野 博之[2] ([1]広島大院統合生命、[2]東大院理)
○Wakana Tanaka[1], Hiro-Yuki Hirano[2] ([1]Grad. Sch. Integr. Sci. Life, Hiroshima Univ., [2]Grad. Sch. Sci., Univ. Tokyo)

イネ科植物の枝分かれは、「分げつ」と呼ばれる。イネの分げつ形成は、穂数を決定し、最終的にコメの収量を左右するため、分げつ形成を司る機構を明らかにすることは非常に重要である。分げつは、植物の成長に応じて新生する腋芽分裂組織（メリステム）に由来するが、その腋芽メリステムの形成機構については、ほぼ未解明であった。私たちは、分げつが形成されない *tillers absent1* (*tab1*) 変異体を活用して、腋芽メリステムの形成機構の一端を以下のように明らかにした。

tab1 変異体を用いた形態観察や分子レベルでの解析によって、*TAB1* 遺伝子の機能が、腋芽メリステムの形成に必須であることを明らかにした（Tanaka et al., Plant Cell, 2015）。さらに研究を進め、*TAB1* 遺伝子の機能が、腋芽形成過程の幹細胞維持に必須であることを示した（Tanaka and Hirano, New Phytol., 2020）。加えて、*FLORAL ORGAN NUMBER2* (*FON2*) 遺伝子が、*TAB1* 遺伝子の発現を抑制することにより、腋芽形成過程の幹細胞維持の抑制因子として機能していることも見出した（Tanaka and Hirano, New Phytol., 2020）。以上から、幹細胞維持の促進因子 *TAB1* と抑制因子 *FON2* の機能のバランスによって、腋芽形成時の幹細胞が正常に維持されており、それが腋芽メリステムの形成を引き起こし、最終的に分げつ形成につながっているということが明らかになった。

In rice, shoot branch, which is called tiller, is an important agronomic trait, since tiller number determines panicle number. The tiller is produced from an axillary meristem, which continuously emerges at the base of leaf primordium during plant growth. Thus, elucidation of genetic mechanisms underlying axillary meristem formation will contribute not only to understanding of rice development but also to improvement of rice yield. Although a considerable number of studies have been made on formation of the shoot apical meristem, very little studies have been made on axillary meristem formation. To clarify the genetic mechanism of the axillary meristem formation in rice, we performed detailed developmental analyses focusing on stem cells. We revealed that *TILLERS ABSENT1* (*TAB1*) and *FLORAL ORGAN NUMBER2* (*FON2*) play important roles in the maintenance of the stem cells at an early stage of axillary meristem development, and this maintenance is essential for the progression of axillary meristem formation (Tanaka et al., Plant Cell, 2015; Tanaka and Hirano, New Phytol., 2020).

Plant development, Tiller formation, Rice (*Oryza sativa*)

発表責任者：田中 若奈（wakanat@hiroshima-u.ac.jp）

講演番号：2H02-10
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 09:30～ ミーティングルーム H

転写制御ネットワーク網羅的解析技術を用いたイネ側根メリステムサイズの調節機構の解析

Elucidation of regulation mechanism of rice lateral root meristem size using transcriptional regulatory network comprehensive analysis technology

○安福 航希、兒島 孝明、犬飼 義明、岡 大椰、中野 秀雄 (名大院・生命農学)
○Kohki YASUFUKU, Takaaki KOJIMA, Yoshiaki INUKAI, Hiroya OKA, Hideo NAKANO (Grad. Sch. Bioagric. Sci., Nagoya Univ.)

【背景と目的】イネの側根分裂組織(メリステム)サイズ制御機構には、標的遺伝子の発現を制御する転写因子(TF)が中心的な役割を担っているものの、その多くの転写因子の詳しい機能は未知である。我々は高速 DNA シーケンス技術を駆使したトランスクリプトーム解析システムを確立している。そこで本研究では、イネの細胞壁形成に関与する TF である OsbZIP1 によって発現制御される遺伝子を網羅的に同定し、OsbZIP1 を介した側根メリステムサイズの制御機構を解明することを目的とした。
【結果】イネ野生株および OsbZIP1 変異株のそれぞれから抽出した RNA を用いた RNA-Seq によって OsbZIP1 依存的に発現変動する数百種類の DEG を同定した。さらに、OsbZIP1 によって直接的に発現制御される遺伝子の網羅的同定を行うため、gSELEX-Seq を用いた OsbZIP1 のゲノム上の結合部位の同定を行い、OsbZIP1 の結合モチーフを検出した。この結合モチーフ情報をもとに、プロモーター領域に結合モチーフを含む遺伝子のデータセットと RNA-Seq で検出した DEG との積集合を抽出したところ、ストレス応答や細胞壁に関与すると見られる遺伝子などを含む 328 個の遺伝子が検出された。
【Introduction】 Although transcription factors (TFs) that regulate the expression of target genes play a central role in regulating lateral root meristem size in rice, the functions of many of the TFs are still unclear. We have established a transcriptome analysis system that utilizes high-thoughput DNA sequencing technology. This study aimed to comprehensively identify genes regulated by OsbZIP1, a TF involved in rice cell wall formation, and to elucidate the mechanism of OsbZIP1-mediated regulation of lateral root meristem size.
【Results】 Fist, we identified hundreds of differentially expressed genes (DEGs) whose expression varies in an OsbZIP1-dependent manner by RNA-Seq using RNA extracted from rice wild-type and OsbZIP1 mutant strains, respectively. Furthermore, to comprehensively identify genes whose expression is directly regulated by OsbZIP1, we used gSELEX-Seq to identify the binding sites of OsbZIP1 on the genome to detect OsbZIP1 binding motifs. Based on this binding motif information, the intersection of a dataset of genes containing the binding motif in the promoter region and DEGs detected by the RNA-Seq analysis was extracted, followed by the detection of 328 genes, including those thought to be involved in the stress response and the cell wall.

Oryza sativa, gSELEX-seq, RNA-Seq

講演番号：2H02-11
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 09:30～ ミーティングルーム H

ラズベリー培養細胞を用いたフラボノイド変換反応

Flavonoid conversion reactions using raspberry cultured cells

○小堀 亮、齊藤 安貴子（大阪電気通信大学大学院工学研究科先端理工学専攻）
○Ryo KOBORI, Akiko SAITO (Advanced Science & Engineering, Graduate School of Engineering, OECU)

フラボノイドは様々な植物に含まれる機能性ポリフェノール化合物の一群として知られ、様々な健康機能性が期待されている。我々は、フラボノイド、特に機能性が高いと考えられている flavan-3-ol 誘導体について、構造-活性相関研究や分析・定量研究を進めてきた。[1,2]本発表では、ラズベリー培養細胞 (*Rubus idaeus* RAFZAQU 種)を用いたフラボノイド変換検討を行ったので報告する。ラズベリーには、多くのフラボノイド化合物が含まれていることが確認されており、ラズベリー培養細胞 [3]を用いることで様々なフラボノイド化合物が生産できると考えた。そこで、ラズベリー培養細胞に quercetin (**1**)を添加し 6 日間培養後に構造解析を行ったところ、quercetin (**1**)の配糖化反応やメチル化反応が進行した (Fig. 1)。また、他のフラボノイドでも変換反応が進行することが確認された。本発表では、これらの結果をまとめて報告する。

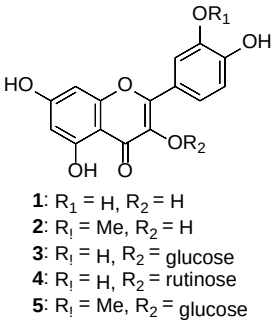


Figure 1. quercetin (**1**)の変換反応

Flavonoid is a group of functional polyphenolic compound found in various plants and expected to have various health functions. We have been conducting structure-activity relationship studies and analytical and quantitative studies on flavonoid dompounds, especially flavan-3-ol derivatives, which are considered to be highly functional. In this presentation, we report the flavonoid conversion studies using raspberry cultured cells (*Rubus idaeus* RAFZAQU). It was confirmed that raspberries contain many flavonoid compounds, and it was thought that various flavonoid compounds could be produced by using cultured raspberry cells[3]. Therefore, when quercetin (**1**) was added to the cultured raspberry cells and structural analysis was performed after culturing for 6 days, the glycosylation reaction and methylation reaction of quercetin (**1**) proceeded (Fig. 1). It was also confirmed that the conversion reaction proceeded with other flavonoid compounds shown in Fig. 1. These results are summarized in this presentation.

1) Y. Higashino *et al*., *Molecules*, **2018**, 23, 205.
2) R. Kobori, *et al*., *Metabolites*, **2019**, 9, 56.
3) A. Tito *et al*., *Int J Cosmet Sci.*, **2015**, 37, 588-594.

raspberry, plant cell, flavonoid

発表責任者：齊藤安貴子（a-saito@osakac.ac.jp）

講演番号：2H02-12
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 09:30～ ミーティングルーム H

大麦穀粒の機能性成分含量に及ぼす変異遺伝子の影響

Effect of selected mutant genes on contents of health-promoting constituents in barley grains.

○野方 洋一[1]、阿部 大吾[1]、長嶺 敬[2]、杉田 知彦[1]、吉岡 藤治[1] ([1]農研機構 西日本農研、[2]農研機構 中央農研)
○Yoichi Nogata[1], Daigo Abe[1], Takashi Nagamine[2], Tomohiko Sugita[1], Toji Yoshioka[1] ([1]Western Region Agricultural Research Center, NARO, [2]Central Region Agricultural Research Center, NARO)

大麦は水溶性食物繊維のβ-グルカンを豊富に含んでおり、健康維持や増進効果が期待される食材として注目されている。農研機構ではこれまでに、ADP-グルコーストランスポーターをコードする *lys5* 遺伝子の変異アリル *lys5h* をもつ高β-グルカン系統を育成してきた。これらの系統はβ-グルカン含量に加えて、フルクタンおよび GABA 含量が増加し、遊離アミノ酸含量も変化する知見を得ている。そこで、高リジン（*lys1*、*lys3a*、*lys5h*）、高アミロース（*amo1*）、低アミロース（*wxa*）、アミロース欠失（*wxb*）、β-グルカン欠失（*bg1*）等の各変異遺伝子を戻し交配により「四国裸 84 号」に導入した準同質遺伝子系統について、穀粒中のβ-グルカン、フルクタン、GABA、および遊離アミノ酸含量を分析した。この結果、β-グルカン含量は既報どおり *wxa*、*wxb*、*amo1*、および *lys5h* 遺伝子の導入により増加したほか、*wxa*、*wxb*、*bg1*、*amo1*、および *lys5h* 遺伝子の導入系統でフルクタン含量の増加が認められた。GABA 含量については、*bg1*、*lys1*、*lys3a*、および *lys5h* 遺伝子の導入効果が高かった。さらに、増加効果をもつ変異遺伝子の二重導入により、各成分の含量が相加的に高まることも確認された。以上の結果から、高機能性大麦の開発のためには、*wxb* と *lys5h* 遺伝子、および *wxb* と *amo1* 遺伝子の二重導入が有用であると判断された。

Barley lines harboring *lys5h* gene, a mutant allele of the *lys5* gene encoding ADP-glucose transporter, have been reported to contain high amount of β-glucan. We examined contents of health promoting constituents in grains of 'Shikoku-hadaka 84' isogenic lines having mutant genes of high lysine content (*lys*), high amylose content (*amo1*), low amylose content (*wxa*), amylose-free (*wxb*) and β-glucan-less (*bg1*), respectively. As a result, β-glucan content increased by the introduction of *wxa*, *wxb*, *amo1*, and *lys5h* mutations as previously reported, and fructan content was observed to increase by the introduction of *wxa*, *wxb*, *bg1*, *amo1*, and *lys5h* mutations. As to GABA, lines introduced by *bg1*, *lys1*, *lys3a*, and *lys5h* mutation exhibited largely increased amount. In addition, the introduction of double mutation was shown to have the additive effect. From the above results, introductions of *wxb* and *lys5h*, and *wxb* and *amo1* were concluded to be effective for developing barley cultivars with higher health-promoting constituents.

barley, beta-glucan, GABA

発表責任者：野方洋一（ynogata@affrc.go.jp）

講演番号：2H02-13
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 09:30～ ミーティングルーム H

ボイセンベリー葉の有効利用について
Functional evalation analysis of components extracted from boysenberry leaves for effective utilization

○橋本 奈々美[1]、水木 徹[4]、三浦 健[1,2,3] ([1]東洋大院・生命科学、[2]東洋大学・生命科学、[3]東洋大学・ライフイノベーション研究所、[4]東洋大学・バイオナノエレクトロニクス研究センター)
○Nanami HASHIMOTO[1], Toru MIZUKI[4], Takeshi MIURA[1,2,3] ([1]Graduate School of Life Sciences, Toyo University, [2]Faculty of Life Sciences, Toyo University, [3]Institute of Life Innovation Studies, Toyo University, [4]Bio-Nano Electronics Research Centre, Toyo University)

【背景・目的】ボイセンベリーはカリフォルニア北部を原産地とするバラ科キイチゴ属の果実である。日本国内でも一部地域で栽培されており、本大学近隣の群馬県館林市でも生産が行われている。ボイセンベリーの果実には特有のアントシアニンやエラグ酸、葉酸など美容や健康に良いとされる化合物が多く含有されており、機能性食品として注目を浴びている。一方でボイセンベリーの葉は利用されず、すべて廃棄されているのが現状である。そこで我々は葉を用いた研究を行っている。本発表では、葉の有効活用の検討結果について報告する。

【結果・考察】抗菌性試験としてディスク拡散法を行ったところ、*Bacillus subtilis* NBRC3134 と *Staphylococcus aureus* NBRC12732 において生育阻止円が見出された。また、抗酸化活性の測定方法として DPPH ラジカル消去活性法を用いたところ、果実と比較して約 30 倍もの抗酸化活性を有していることが明らかになった。さらに、結腸がん細胞（DLD-1）においては 24 時間培養した時点ですでに生存率が 50%を下回っていた。したがってボイセンベリー葉含有化合物が抗菌活性や抗酸化活性を有しているだけでなく、抗がん性を有していることが示唆された。

【Background and Purpose】Boysenberry is a fruit, classified in the genus *Rubus* of the *Rosaceae* family, native to northern California and it has recently been cultivated in several area in Japan, including Tatebayashi City near the Itakura campus of Toyo University. The fruit of boysenberry contains many compounds that are considered to have beneficial effect on beauty and health such as specific anthocyanins, ellagic acid and folic acid. On the other hand, the leaves of boysenberry, that also have beneficial components, are not used and are all discarded, therefore, we aimed to effectively utilize the leaves as biomass.

【Result and Discussion】We investigated the growth inhibition effect of leaf extract on *Bacillus subtilis* NBRC3134 and *Staphylococcus aureus* NBRC12732 by a disk diffusion assay as an antibacterial test, and confirmed that inhibition circle formed on the peripheries of the disk with the extract. DPPH radical scavenging assay was performed as an antioxidant test, it was clarified that the antioxidant activity of boysenberry leaf extract was about 30 times higher than that of the boysenberry fruit. Furthermore, we have demonstrated that leaf extract of boysenberry has an inhibition effect on the cancer growth. 50% of growth inhibitory effect in 24 hours has been shown on DLD-1, that is a colorectal adenocarcinoma cell lines, cultured in a medium supplemented with the leaf extract.

boysenberry, biomass, functional food

発表責任者：橋本奈々美（s39101900160@toyo.jp）

講演番号：2H02-14
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 09:30～ ミーティングルーム H

切り花の鮮度保持におけるナノバブルの作用機構

Mechanism of action of nanobubbles in retaining freshness of cut flowers

○中澤 利恵[1]、田中 玲桐[2]、畑 直樹[1]、南川 久人[3]、原田 英美子[1]([1]滋賀県大・環境科学、[2]滋賀県大院・工、[3]滋賀県大・工)
○Rie NAKAZAWA[1], Akito TANAKA[2], Naoki HATA[1], Hisato MINAGAWA[3], Emiko HARADA[1] ([1]The Univ. of Shiga Pref., School of Environ. Sci., [2]The Univ. of Shiga Pref., Graduate School of Engineering, [3]The Univ. of Shiga Pref., School of Engineering)

ナノバブル水による植物の成長促進や、魚やマウスの代謝の向上が報告されている。ナノバブルを含む生け水に切り花を挿すと、鮮度が長く保持されるとされているが、そのメカニズムについては明らかになっていない。そこで本研究では、蕾期に収穫されたキク（*Chrysanthemum* × *morifolium*）の切り花を供試材料として、花茎（全長 40cm、葉数 19 枚）の下端 7cm を 31 日間、蒸留水もしくはナノバブル水（UFB 発生装置を用いて、蒸留水に溶解圧力 108－112MPa で 10 分間通気を行い作成）に挿し、鮮度保持効果と水吸収動態を比較した。鮮度保持効果は、葉の鮮度（SPAD 値および萎凋の有無）、処理後の開花迄日数、開花後、花が萎れるまでの日数（花の開き、花弁の縮れ・褐変）で評価した。SPAD 値および開花迄日数は、蒸留水区とナノバブル水区で差がなかったにもかかわらず、花が萎れるまでの日数は、ナノバブル水区で 11 日長く、ナノバブル水により、キク切り花の鮮度は長期間維持されることが示された。さらに、数種の植物で蒸散の抑制が切り花の延命に効果があることが示されているように、本実験でも 31 日の処理期間中のナノバブル水区の総蒸散量は、対照区と比較して約 55％まで減少していた。蒸留水とナノバブル水の物理的特性の差異が蒸散量の差に関連していると推測されたことから、修正懸滴法により蒸留水とナノバブル水の表面張力を測定するとともに、SEM を用いてキクの導管径を測定して、導管を介した地下部から地上部へのナノバブル水の移動性について考察した。

Nanobubble (NB) water has been shown to promote the growth of several plants and animals, however, the mechanism is still unclear. In this study, the bud stage of chrysanthemum (*Chrysanthemum* x *morifolium*) plants were treated with NB water for 31 days. The amounts of transpiration and chlorophyll contents (SPAD value) were measured, and conditions of petals and leaves were scored to evaluate the freshness of cut flowers. The flower buds treated with NB water were bloomed later than control ones. The freshness of leaves and petals were retained longer in NB water than in distillated water. During the 31-day treatment, the total transpiration amount in the plants treated with NB water was reduced to 55 percent compared to the control plants. Based on the surface tension of NB water and the diameter of the xylem of plants, the movement of NB water in plant bodies will be also discussed.

nanobubble water, cut flower, transpiration

講演番号：2H04-01
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 10:30～ ミーティングルーム H

IgA 誘導における Class A CpG オリゴ DNA のアジュバント効果
The adjuvant effect of Class A CpG oligodeoxynucleotide on IgA induction

○山本 祥也、大舘 佳歩、鈴木 卓弥（広島大生生）
○Yoshinari YAMAMOTO, Kaho Odate, Takuya Suzuki (Hiroshima Univ)

免疫グロブリン A（IgA）は、粘膜面からの病原体の侵入を阻止する第一線として重要な生体内分子である。そのため、粘膜面において IgA を誘導する食品や薬剤は、感染防御機能を増強する機能性素材として期待されている。

我々の研究グループでは、多彩な免疫機能性を発揮する細菌ゲノム DNA 配列由来の核酸素材である CpG オリゴ DNA（CpG ODN）をアジュバントとする IgA 誘導型経口粘膜ワクチンの開発を目指している。CpG ODN は、塩基配列の特徴や免疫活性の違いにより、A・B・C の 3 つの Class に分類される。しかしながら、小腸の粘膜面における各種 Class CpG ODN の IgA 産生への影響はわかっていない。これまでの研究では、マウス小腸パイエル板細胞をリポ多糖や Salmonella Typhimurium などの抗原とともに各種 Class CpG ODN で刺激・培養したところ、Class A CpG ODN が抗原誘導性の IgA 産生を増強することを見出した。一方、Class B および C CpG ODN では抗原誘導性 IgA 産生の増強効果は確認されなかった。以上より、Class A CpG ODN は IgA 誘導型経口粘膜ワクチンのアジュバントに有効であることが示唆された。

本講演では、上記の研究とともに、Class A CpG ODN による IgA 増強機構について紹介する。

Immunoglobulin A (IgA) is the main effector of the mucosal immune system and provides an important first line of defense against most pathogens that invade the body at a mucosal surface. Therefore, Foods and medicine which can induce IgA at a mucosal surface are expected as the functional materials that enhance infection protective function. CpG oligodeoxynucleotides (CpG ODNs) are DNA molecules that exert many types of immune function and derived from bacterial genomic DNA sequence. Our research group is aiming for developing new oral mucosal vaccine using CpG ODNs as an adjuvant. CpG ODNs are classified into three main classes: A, B and C. However, the effect of each Class CpG ODN on IgA induction at a mucosal surface of the small intestine is unclear. We found that co-stimulation of antigen such as lipopolysaccharide and Salmonella Typhimurium, and Class A CpG ODN significantly increased IgA production when compared to stimulation of antigen alone in mouse Peyer’s patch cells. Whereas, Class B and C CpG ODN did not show the same response. Therefore, these data suggested that Class A CpG ODN is effective for oral mucosal adjuvant which induce IgA.

Mechanical study of adjuvant activity by Class A CpG ODN will also be presented in this symposium.

CpG ODN, Adjuvant, IgA

発表責任者：山本 祥也（yamamo59@hiroshima-u.ac.jp）

講演番号：2H04-02
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 10:30～ ミーティングルーム H

霊長類 T1R1 および T1R2 抗体の作製

Generation of antibodies against primate T1R1 and T1R2

○小松 さゆり[1,2]、中安 亜希[1]、大島 永心[1]、新藤 壮剛[1]、今井 啓雄[3]、伯川 美穂[2]、杉山 宗太郎[3]、綾部 時芳[2]、中村 公則[2]、山根 拓実[1]、大石 祐一[1]、岩槻 健[1] ([1]東京農大、[2]北大、[3]京大)
○Sayuri Komatsu[1,2], Aki Nakayasu[1], Eishin Oshima[1], Masayoshi Shindo[1], Hiroo Imai[3], Miho Hakukawa[2], Sotaro Sugiyama[3], Tokiyoshi Ayabe[2], Kiminori Nakamura[2], Takumi Yamane[1], Yuichi Oishi[1], Ken Iwatsuki[1] ([1]Tokyo Univ. of Agriculture, [2]Hokkaido Univ., [3]Kyoto Univ.)

我々が作製に成功した霊長類味蕾オルガノイドは、味覚関連因子を発現し、味覚応答の測定が可能な細胞である。しかし、霊長類のうま味・甘味受容体（T1R1/T1R3・T1R2/T1R3）に対する抗体が存在しないことから、これら受容体タンパクの発現は確認できていない。そこで我々は、霊長類 T1R1 および T1R2 の抗体を作製し、同培養系の発現解析を行った。霊長類の T1R1 および T1R2 を認識できるよう抗原ペプチドを設計し、抗体を取得し、これらの抗体が特異的に各受容体を検出できるかを、HEK293 を用いた受容体の強制発現系およびサル有郭乳頭を用いた免疫組織化学染色により確認した。さらに、この抗体が、味蕾オルガノイドにおいても T1R1 および T1R2 を検出することも確認した。また、味蕾オルガノイドにおける味覚応答が味覚受容体を介しているかを、受容体の阻害剤を用いて確かめた。Ca^{2+} imaging 法を導入し、味覚受容体により応答が消失されるかを調べた。これらの実験の結果、ヒトおよびアカゲザル T1R1、T1R2 に特異的な抗体作製に成功した。また、T1R3 受容体の阻害剤である lactisole は甘味応答を阻害することが分かり、味蕾オルガノイドにおける味覚応答は味覚受容体を介することが示唆された。今後、味覚受容体の詳細な発現局在の解明や味評価系の確立に寄与したい。

Primate taste organoids that we have established express taste-related genes responsible transducing taste signals. Although we believe taste responses are through taste receptors, the expression of umami and sweet receptor protein is not confirmed. Therefore, in this study, we have generated and examined specificities of primate T1R1 and T1R2 antibodies. Using these antibodies, we analyzed the expression of T1R1 and T1R2 receptors within HEK293 cell that express T1Rs and monkey circumvallate papillae. Next, we confirmed that taste organoids express T1R1 and T1R2. Furthermore, we confirmed by Ca^{2+} imaging whether taste responses were obtained through taste receptor signaling. Our result using lactisole, an inhibitor of T1R3, showed blockage of sweet taste responses. In this study, we succeeded in establishing T1R antibody. This study may contribute to elucidate expression of taste signaling and establishing a new taste senser.

prime taste receptor, antibody, organoid

発表責任者：岩槻健（ki204886@nodai.ac.jp）

講演番号：2H04-03
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 10:30～ ミーティングルーム H

抗線維化薬ピルフェニドンの薬理作用点同定に向けた探索研究

Exploratory study to identify the pharmacological target of anti-fibrotic drug, pirfenidone

○竹内 大修、辰川 英樹、横島 聡、人見 清隆 (名大院創薬科学)
○Taishu TAKEUCHI, Hideki TATSUKAWA, Satoshi YOKOSHIMA, Kiyotaka HITOMI (Grad Sch Pharm Sci, Nagoya Univ.)

特発性肺線維症 (IPF) は罹患者の約 7 割が診断後 5 年以内に死亡する原因不明の難治性疾患である。病態進行に関連する詳細な分子メカニズムは解明されておらず、根本的な治療方法も存在しない。線維化抑制薬ピルフェニドンは本邦で 2008 年に世界で初めて認可された IPF の治療薬であるが、光過敏症や胃腸障害など多くの副作用が問題視されている。薬理作用は炎症性因子の産生抑制、抗炎症性因子の作用亢進、線維化に関わるサイトカイン抑制など複合的な要因であり、標的分子は不明瞭である。本研究ではジアジドベンジル基を修飾したピルフェニドン類縁体を用いて、近傍に存在する標的分子を UV により架橋し、クリック反応により標的結合分子を標識した後、アフィニティー精製およびタンパク質同定を行う。構造活性相関解析により多種のジアジド標識ピルフェニドン類縁体を合成した後、肺線維化を誘導した培養細胞モデルにおいて薬効を示す有用な類縁体の取得に成功した。さらに、これを用いて肺胞上皮細胞の抽出液中でのビルフェニドン標的分子を探索する実験系の条件検討を行い、ピルフェニドンとの結合を示す標識ラベル化された候補タンパク質を有意に検出した。今後はアフィニティー精製を行い、質量分析による候補標的因子の同定を目指す。

Idiopathic pulmonary fibrosis is a chronic scarring lung disease. The detailed molecular mechanisms of disease progression are not understood and there are no fundamental treatment options. The anti-fibrotic inhibitor, pirfenidone, was the first drug approved for the treatment of IPF in Japan, however it has been associated with several side effects including photosensitivity and gastrointestinal injury. The specific target molecules of this drug are unclear because this pharmacological action is due to a combination of factors including suppression of inflammatory-related factors and cytokines involved in fibrosis. In this study, the several diazidobenzyl-modified pirfenidone analogues were synthesized and used to be cross-linked with neighboring target molecules by UV radiation and labeled target molecules by click chemistry reaction and followed by affinity purification of proteins which bind to pirfenidone. We obtained useful analogues that have similar activity with pirfenidone in fibrosis-induced lung cells and significantly detected the labeled target molecules in cell extracts in the established experimental system.

chemical biology, affinity purification, Idiopathic Pulmonary Fibrosis

発表責任者：竹内大修（takeuchi.taishu@e.mbox.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：2H04-04
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 10:30～ ミーティングルーム H

Hydrogen sulfide suppresses the proliferation of intestinal epithelial cells through cell-cycle arrest

○WENXI XU, Yoshinari Yamamoto, Takuya Suzuki (Hiroshima Univ.)

[Background/objective] The pathogenesis of chronic kidney disease (CKD) is closely related to the changes of the intestinal microbiota and integrity. Our previous studies showed the accumulations of hydrogen sulfide (H_2S) and the H_2S-producing bacteria family, *Desulfovibrionacea*, in the colon of a murine model of CKD, suggesting that the increased H2S contributes to the impaired intestinal integrity in CKD. Here, we investigated the anti-proliferative effect of H_2S in intestinal epithelial cells.

[Methods/results] Treatment of GYY4137, a slow-releasing H_2S donor, reduced the proliferation of intestinal epithelial Caco2 and IEC-6 cells in a dose-dependent fashion. Flow cytometry revealed that the anti-proliferative effect of GYY4137 was occurred by S phase arrest in Caco-2 cells. To understand the underlying mechanisms, the GYY4137-treated Caco-2 cells were applied to the RNA sequencing analysis (RNA-Seq). The RNA-seq found that GYY4137 robustly increased a cell cycle-related gene, CDKN1A, which encodes p21 protein. This increment was confirmed by quantitative RT-PCR and western blot analyses in Caco2 cells. However, the GYY4137 did not increase the promoter activity of CDKN1A based on the luciferase reporter assay, indicating that the stability of CDKN1A mRNA was increased by GYY4137.

[Discussion/conclusion] Altogether, our data uncovered the evidence of the anti-proliferative action of H_2S in intestinal epithelial cells, and it is possibly due to the S phase arrest by up-regulating CDKN1A expression. This may be one of the underlying mechanisms for the impaired intestinal integrity in CKD.

hydrogen sulfide, cell Proliferation, cell cycle

発表責任者：Takuya Suzuki（takuya@hiroshima-u.ac.jp）

講演番号：2H04-05
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 10:30～ ミーティングルーム H

培養ヒト表皮細胞の分化に空気暴露が必須とされるメカニズムの解析

Mechanism by which air-exposure is essential for cultured keratinocyte differentiation

○伊藤 帆南、手島 裕文、辰川 英樹、人見 清隆（名大院創薬科学）
○Honami ITO, Hirohumi TESHIMA, Hideki TATSUKAWA, Kiyotaka HITOMI (Grad Sch Pharm Sci, Nagoya Univ.)

【背景・目的】

皮膚表皮の細胞は基底部の未分化な細胞が分化増殖し、最外層へ向けて脱核した角化細胞へと成熟して角質層を形成する。この一連の分化過程は細胞培養でも立体的な細胞層の形成が再現できるが、その際には特殊な培養条件を必須とする。すなわち分化の開始にあたって、増殖させた細胞を気相に接触させる「空気暴露」操作（気相培養）が必要になる。このような表皮細胞培養系は古くから確立され利用されてきたが、空気暴露が表皮分化を刺激するメカニズムについては明らかではない。

我々はこれまで、空気暴露の有無によって、どのようなタンパク質・遺伝子群の発現の変動が生じるかについて解析を進め、低酸素応答に関する因子群が関与する可能性を示してきた。

本研究ではこの特異な操作による分化刺激メカニズムの解明をめざし、気相培養の有無での発現遺伝子の挙動や、低酸素応答関連因子の発現量と分化との関連を明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】

分化の開始時に空気暴露を行う群（以下 Air）と行わない群（以下 Liq）とを立体的に培養し、角化の形成度や発現レベルに差異のある遺伝子・タンパク質を比較検討した。さらに、Air・Liq 培養時でのトランスクリプトーム解析において顕著に差異の見られた、低酸素応答因子 HIF1-alfa を負に制御する酵素「PHD3(prolyl hydroxylase 3)」に着目して、表皮形成過程における経時的な発現変動を、分化マーカーとともにタンパク質・遺伝子レベルで解析した。

その結果、表皮が正常に形成される Air において PHD3 は低下し、分化が妨げられた Liq において発現が増加した。さらに低酸素応答因子を制御する薬剤を用いて表皮の分化の進行度を検討したところ、分化増殖に影響を与えることが示唆され、現在その詳細についてさらに解析を進めている。

Upon three-dimensional culture of human keratinocyte, air-liquid phase culture is essential for differentiation.

However, the mechanism by which air exposure provides signal for differentiation remains unknown. We performed transcriptome analysis using mRNAs from the cultured keratinocytes with or without air-exposure.

Among the genes with different level, we focused on PHD3 that enzymatically regulates the HIF1alfa, hypoxia-inducible transcription factor. By analyses of the expression of PHD3 mRNA and protein, this molecule appeared to fluctuate depending on differentiation, suggesting that hypoxia is involved in this regulation. Using regulatory reagents for hypoxia-inducible factors, additional evaluation for differentiation is ongoing.

Keratinocyte, HIF, differentiation

講演番号：2H04-06
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 10:30～ ミーティングルーム H

マウスの胎生段階における表皮形成と羊水中の促進因子の解析

Epidermal formation in mouse embryo and analysis of amniotic fluid

○川口 友輔、栗林 美樹、手島 裕文、辰川 英樹、人見 清隆 (名大院創薬科学)
○ Yusuke KAWAGUCHI, Miki KURIBAYASHI, Hirohumi TESHIMA, Hideki TATSUKAWA, Kiyotaka HITOMI (Grad Sch Pharm Sci, Nagoya Univ.)

【目的】表皮は最深部にある未分化な幹細胞が分化増殖して成熟した角化細胞となって形成される。培養細胞系でも表皮分化は再現が可能で、この際には細胞をフィルター上で培養してから培地を除き下部から培地を浸潤させる「空気暴露」が必須である。このように表皮分化には空気暴露が必須であるという現象に反して、子宮内で胎仔の表皮が形成される際には羊水に満たされている。そのため、羊水中には表皮形成を制御する因子・メカニズムが存在することが推測される。胎生段階による胎仔の表皮形成や羊水成分の詳細も不明であるため、本研究ではマウス胎仔および羊水を用いて胎生段階における表皮形成の性状、羊水中に存在するタンパク質成分の質的な変動を調べるとともに、ここに存在する表皮細胞分化を制御する因子の探索を目的とした。
【方法・結果】胎生段階の異なる胎仔の表皮について、染色液を用い形態および表皮としてのバリア機能を評価した。さらに表皮のバリア形成に必須なタンパク質架橋化酵素・トランスグルタミナーゼ（TG1, TG3）の酵素活性染色を行って形成度の進行を評価した。それらの結果、胎生段階に依存して酵素活性が上昇し、バリア機能を獲得することが明らかとなった。さらに各胎生段階での羊水を回収して SDS-PAGE および質量分析を行ったところ、胎生日数によって羊水中のタンパク成分が大きく変動することを明らかにした。
　さらに、表皮初代細胞に羊水を添加して培養しその分化制御能について検討した。その結果、表皮の分化マーカーであるインボルクリンや SPR3 などがタンパク質レベルでの発現上昇がみられたことから、羊水の中に分化促進をする因子の存在を確認した。

For skin epidermis formation, keratinocyte differentiates accompanying with tough barrier structure. This differentiation can be reproduced by cultured keratinocytes, which are subjected to air/liquid interphase culture. However, in the uterus, surrounded in amniotic fluid (AF), embryo epidermis is formed without air exposure.

We investigated embryo epidermis formation in several developing stages regarding barrier function. Also, we evaluated the transglutaminase activities that are essential for barrier formation. Then, to analyze the components of AF at several stages, AF was subjected to SDS-PAGE and mass spectrometry. Depending on the stages, various distinct proteins were identified. To identify and characterize the possible regulatory factors in AF, using human primary cultured keratinocytes, AF was added in the culture medium and the expression levels of differentiation marker were examined. AF appeared to contain possible inducible factors for keratinocyte differentiation.

skin, epidermis, differentiation

発表責任者：川口友輔（kawaguchi.yusuke@h.mbox.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：2H04-07
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 10:30～ ミーティングルーム H

神経細胞 HT22 における温熱依存的な PGRN の発現制御

Heat-dependent regulation of PGRN expression in nerve cell HT22

○沈 玉菠、藤井 拓都、下田 歩夢、下川 裕理夏、佐藤 飛翔、根建 拓（東洋大学）
○Yuepo Chin, Takuto Fujii, Ayumu Shimoda, Yurina Shimokawa, Tsubasa Satou, Taku Nedachi (Toyo Univ.)

プログラニュリン (progranulin; PGRN)は、様々な神経細胞のストレスによって発現上昇する成長因子であり、神経細胞の保護や細胞外小胞 (extracellular vesicles; EVs)の放出制御など多くの生理活性を有している。一方、脳内の温度上昇にともなう PGRN 発現制御については不明な点が多い。そこで本研究では、マウス海馬由来神経細胞 HT22 における温度依存的な PGRN 発現制御およびその生理的意義を明らかにすることを目的とした。

まず、HT22 細胞に対する温度刺激条件を設定するため、HT22 を様々な温度（37-41℃）で培養し、熱応答マーカータンパク質である HSP70 の発現を解析した結果、温度依存的な HSP70 発現上昇が確認された。次に、同様の条件で *Pgrn* 遺伝子発現を解析したところ、こちらも温度依存的な発現増加が観察され、特に 41℃で培養することで約 2.7 倍に発現増加することが明らかとなった。さらに、HT22 細胞の培養上清に放出される EVs を動的光散乱法によって解析した結果、温熱刺激による粒子径への影響は見られなかったものの放出量が約 2 倍に増加することが分かった。すなわち、神経細胞への温熱処理は、PGRN 発現を増加させ、これによって EVs 分泌が増加する可能性が示された。

Pgrn 遺伝子変異による PGRN 発現システムの破綻は、FTLD や ALS などの神経変性疾患と関連することが報告されている。すなわち、温熱をはじめとするストレス依存的な PGRN 発現制御は、細胞保護や EVs 制御などを介した脳内環境の恒常性維持に重要である可能性が考えられる。

Progranulin (PGRN) is a multifunctional growth factor, and the expression of PGRN is tightly regulated by numerous stressors, such as oxidative stressors. On the other hand, although the brain temperature is often increased after major brain injuries, whether heat-stress modifies PGRN expression is not fully understood. In this study, we examined if PGRN expression is controlled by heat-stress in mouse HT22 hippocampal cells.
When HT22 cells were incubated at various temperatures (37-41 C) for 24 hours, *Pgrn* gene expression was gradually increased by the elevation of temperature, correlating with the expression of heat shock marker, HSP70. Moreover, heat stimulus also enhanced the release of extracellular vesicles (EVs), that was partially regulated by PGRN. This heat-dependent regulation of PGRN in neurons may contribute on the adequate expression of PGRN and EVs in central nervous system.

Heat, Progranulin, EVs

講演番号：2H04-08
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 10:30～ ミーティングルーム H

マウス細胞の寒冷刺激耐性機構とベージュ脂肪細胞への分化

Mechanisms to protect from cold stimulation and differentiaion to beige adipocytes in mouse cells

○塩見 尚史、冨士原 由貴（神戸女学院人間科学）
○Naofumi Shiomi, Yuki Fujiwara (Kobe College)

［目的］ヒトは低温刺激を受けると、脳からノルアドレナリンが分泌されてアドレナリン受容体と結合し、それを介して UCP1 あるいは褐色脂肪細胞が誘導されることが知られている。一方、マウスのような体温の変化する生物では、細胞を守るために寒冷刺激に対してもっと迅速に適応する必機構が備わって可能性がある。そこで、マウス細胞に直接寒冷刺激を与えた場合の応答について研究した。
［結果及び考察］37℃で培養したマウス筋芽細胞 C2C12 と白色脂肪細胞 3T3-L24 に対して、15℃と 4℃で 1 時間寒冷刺激を与えた。その結果、いずれの細胞でも、ミトコンドリア増加とベージュ脂肪細胞のマーカー遺伝子の発現量が高まり、その発現量はノルアドレナリンを添加した場合よりも高かった。次に、筋芽細胞を用いて、寒冷刺激によりこれらの遺伝子発現量が高まる機構について調べた。寒冷刺激による Ca^{2+}イオンの流入量と cAMP の量を調べた結果、寒冷刺激により Ca^{2+}イオンの流入量が増加し、cAMP の量も増加した。また、Ca^{2+}イオンの流入量は、TRP チャネル阻害剤により抑制された。このことから、寒冷刺激を受けると TRP チャネルを通じて Ca^{2+}イオンを取り込み、アデニル酸シクラーゼが活性化されて cAMP が増加し、PRMD16 や PGC1a などのベージュ脂肪細胞に分化を促すと考えられた。また、寒冷刺激を継続すると、ベージュ脂肪細胞に分化した。このように、マウスの細胞では低温刺激対して細胞が直接応答する機構が備わっていることを見いだした。

[perspective] When a man is exposed under severe cold condition, the differentiation to brown adipocyte is gradually performed by the effects of noradrenalin secreted from brain. However, in case of mouse which body temperature is liable to change, another urgent refuge pathway to protect from chilling injury seems to be equipped. Thus, we examined whether mouse cells equip such mechanisms or not.

[Results and discussion] Mouse myoblasts and white adipocytes were exposed at 15℃ and 4℃ for 1 h, and the expression of genes was examined. By the exposure under cold condition, the genes related to increase of mitochondria and induction to bright adipocytes were enhanced. Next, the reason of increase was examined. When the cells were exposed under cold condition, both uptake amount of Ca^{2+} ion and the amount of cAMP in cells were increased, and TRP channel inhibitor inhibits the uptake of Ca^{2+} ion. These results suggest that cold stimulation induces the uptake of Ca^{2+} ion which transmits to AMP cyclase. Finally, effects of cold stimulation for a long period on mouse white adipocytes were examined. By several times of cold stimulation, mouse white adipocytes were differentiated to beige adipocytes by stimulation.

white adipocyte, brown adipocyte, cold resistance

発表責任者：塩見尚史（n-shiomi@mail.kobe-c.ac.jp）

講演番号：2H04-09
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 10:30～ ミーティングルーム H

マウス真皮線維芽細胞における温熱依存的なコラーゲン産生調節

Heat-dependent regulation of collagen production in mouse dermal fibroblasts

○中島 翼空、森 彩乃、吉川 綾乃、佐藤 （石内） 友里、根建 拓（東洋大）
○Tasuku Nakajima, Ayano Mori, Ayano Yoshikawa, Yuri Sato (Ishiuchi), Taku Nedachi (Toyo Univ.)

皮膚真皮組織への暑熱刺激は、細胞外マトリクス（Extracellular Matrix; ECM）の産生を減少させることで老化を促進することが報告されている。一方、どの程度の温度上昇が ECM の減少を引き起こすのかについては不明な点が多く残っており、ECM 減少を制御する分子メカニズムも不明である。そこで本研究では、真皮組織における主要 ECM であるコラーゲンに注目し、マウス皮膚組織における温熱刺激依存的なコラーゲン制御を解明することを目的とした。

まず、C57BL/6 マウスに対して 12 時間おきに 45℃、30 分の条件で 2 週間慢性暑熱を与えた後、真皮組織を単離して遺伝子発現解析を行った。その結果、暑熱群では、熱マーカー*HSPa1a* とともに *Col1a1* 遺伝子の発現量が有意に増加することが分かった。次に、初代培養マウス真皮線維芽細胞を様々な温度条件下（37～42℃)で 24 時間培養し、*Col1a1* 遺伝子発現およびコラーゲン分泌量を解析したところ、41℃までは温度依存的にコラーゲンの発現分泌上昇が認められたが、42℃の条件では逆にコラーゲンの発現分泌が減少することが明らかとなった。さらに、真皮線維芽細胞において暑熱依存的に分泌変動する因子を探索した結果、コラーゲン分解酵素を阻害することが知られている Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1)の分泌が暑熱負荷により有意に上昇することが明らかとなった。

これまで皮膚への暑熱刺激は皮膚老化の一因であると考えられてきたが、本研究においてマウス真皮線維芽細胞に対する 41℃までの温熱刺激は、コラーゲンの合成促進および分解抑制を介して、真皮組織におけるコラーゲン量を増加することが示唆された。すなわち、皮膚に対する適度な温熱負荷は、皮膚老化を逆に抑制する可能性が考えられる。

Heat stimulus on skin has been recognized to induce aging by attenuating collagen production. In this study, we examined if the elevation of temperature lineally decreases collagen production in mouse dermal fibroblasts. When fibroblasts were incubated at 42 C for 24 hours, we observed the reduction of *Col1a1* gene expression; however, incubation at 39-41 C rather increased *Col1a1* gene expression as well as total collagen production. Moreover, we found the secretion of TIMP-1, which inhibits collagen degradation, was induced by heat stimulus. Overall, our present study suggests the appropriate heat stimulus on skin enhances collagen production, which may contribute on delaying skin aging.

skin, collagen, heat

発表責任者：中島翼空（s19201700538@toyo.jp）

講演番号：2H04-10
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 10:30～ ミーティングルーム H

短期温熱処理による骨格筋マイオカインの動態変化

Regulation of myokines by acute heat treatment in skeletal muscle cells

○村田 圭吾、大川 俊也、渡邉 拓実、佐藤（石内）友里、根建 拓（東洋大）
○KEIGO MURATA, SHUNYA OKAWA, TAKUMI WATANABE, YURI SATO (ISHIUCHI), TAKU NEDACHI (Toyo Univ.)

骨格筋はマイオカインと呼ばれるタンパク質やペプチドを分泌しており、筋収縮によるマイオカインの分泌変化は全身に運動情報を伝達するための重要なしくみのひとつと考えられている。さらに近年、マイオカインの分泌は運動以外にも栄養条件の変化などによっても制御されることが分かってきた。一方、骨格筋では環境温度の上昇などに伴う温熱刺激によって様々な生理変化が生じることが分かっているが、温熱依存的なマイオカイン制御については不明な点が多い。そこで本研究では、マウス骨格筋細胞 C2C12 を用いて温熱依存的なマイオカインの発現制御を解明することを目的とした。

まず、C2C12 筋管細胞に対する様々な温熱負荷条件を検討した結果、42℃で 24 時間の温熱刺激を行うことで熱マーカーである HSP70 の発現が有意に上昇することが分かった。次に、同条件で刺激した C2C12 筋管細胞の培養上清をサイトカインアレイおよび ELISA で解析した結果、温熱刺激によって C-C motif chemokine ligand 5 (CCL5)及び C-X-C motif chemokine ligand 10 (CXCL10)が顕著に減少することが明らかとなった。また、qPCR を用いた解析の結果、これら CCL5 及び CXCL10 発現減少は遺伝子発現減少によることも示唆された。さらに、温熱依存的な CCL5 及び CXCL10 減少を引き起こす温度条件の詳細を調べたところ、3 時間以上の温熱負荷によって、少なくともその後 21 時間は CCL5 及び CXCL10 の発現分泌減少が持続することも分かった。

本研究で温熱刺激により発現分泌が減少するマイオカインとして同定した CCL5 及び CXCL10 は、免疫機能調節や血管新生に関与することが示唆されており、筋温上昇に伴う全身の生理変化の一部を制御している可能性が考えられる。

Skeletal muscle is recognized as an endocrine organ, producing proteins and peptides, defined as myokines. Some of the myokine secretion is regulated by exercises and nutritional changes; however, whether the changes of temperature in skeletal muscles affects the myokine production has not been unveiled.
In this study, we utilized C2C12 myotubes and cytokine array system, and identified CCL5 and CXCL10 as novel heat-dependent myokines. When C2C12 cells were exposed to 42 C for at least 3 hours, obvious reduction of CCL5 and CXCL10 was observed, which kept for at least 21 hours. Since these myokines implicate in immune responses and angiogenesis, it could be speculated that the elevation of temperature in skeletal muscle transduces heat-signals to the other cells/tissues, at least in a part, by these myokines.

skeletal muscle, myokine, heat

発表責任者：村田圭吾（cafeore917@gmail.com）

講演番号：2H04-11
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 10:30～ ミーティングルーム H

摂食時間制限が体重増加、脂質代謝、摂食パターンに及ぼす影響

The effect of time restricted feeding on body weight gain, lipid metabolism and eating pattern.

○小西 菜々星[1]、三浦 徳[2]、奥江 紗知子[3]、増澤（尾﨑） 依[1]、細野 崇[1,3]、関 泰一郎[1,2,3]([1]日大・生資科・生命化、[2]日大・生資科・総合研究所、[3]日大院・生資科・応生科)
○Nanase KONISHI[1], Atsushi MIURA[2], Sachiko OKUE[3], Yori OZAKI-MASUZAWA[1], Takashi HOSONO[1,3], Taiichiro SEKI[1,2,3] ([1]Nihon Univ., [2]Nihon Univ. General Research Institute, [3]Nihon Univ. Grad. School)

【背景・目的】食事を介して摂取する脂質の種類と量、摂取のタイミングは健康と密接に関係している。これまでに我々は、高脂肪食を給餌したマウスでは、暗期に加えて明期にも摂餌するダラダラ食いが起こること、通常食よりも摂取エネルギーが増加することなどを報告している。本研究では通常食と高脂肪食を給餌したマウスに暗期 8 時間の摂食時間制限（TRF）を実施し、摂餌量や体重増加、摂餌パターンの変化について比較検討した。【方法】C57BL/6J マウスに 60% kcal 脂質含有高脂肪食(HFD, D12492, Research Diets)または 10% kcal 脂質含有通常食（ND, D12450B, Research Diets）を自由に摂餌させる *Ad lib* 群と、暗期 8 時間のみ摂餌させる TRF 群の 4 群に分けて 4 週間飼育し、摂餌量と体重を測定した。試験終了後、血液や肝臓をサンプリングし、各種解析を行った。【結果】HFD-TRF 群では、HFD-*Ad lib* 群と比較して、体重及び精巣上体白色脂肪組織重量は有意に低値を示した。また血漿及び肝臓における中性脂肪、総コレステロール量も HFD-TRF 群で有意に低下した。ND-TRF 群も ND-*Ad lib* 群と比較し、体重は低値を示した。HFD-TRF 群の摂取エネルギーは HFD-*Ad lib* 群よりも低かったのに対し、ND-TRF 群と ND-*Ad lib* 群では摂取エネルギーに差はなかった。【結語】TRF は、HFD 給餌で増加する摂取エネルギーを低下させ、体重増加を抑制することが明らかとなった。現在、*Ad lib* と TRF の摂餌パターンについてさらに検討を行っている。

We reported that mice fed a high-fat diet (HFD) causes so called “eating sloppy” (*i.e.,* eating not only at dark period, but also at light period) and that the energy intake is higher than the normal diet(ND). In this study, we explored the effect of 8-hr time restricted feeding (TRF) at dark period on food intake, weight gain, and feeding patterns. C57BL/6J mice allowed free access to HFD (60% kcal fat) or ND(10% kcal fat) in the *Ad lib* group. In the TRF group, the access to the HFD or ND was restricted only for 8 hrs in the dark period. The HFD-TRF group showed significantly lower body weight gain and epididymal white adipose tissue weight than the HFD-*Ad lib*. The amounts of triglyceride and total cholesterol in plasma and liver were significantly lower in the HFD-TRF group. The ND-TRF group also showed lower body weight than the ND-*Ad lib*. The overall energy intake in the HFD-TRF was lower than that of the HFD-*Ad lib*, whereas there was no difference between the ND-TRF group and the ND-*Ad lib*. Taken together, TRF suppresses body weight gain by suppressing the energy intake increased by HFD feeding.

time restricted feeding, obesity, eating pattern

発表責任者：関　泰一郎（seki.taiichirou@nihon-u.ac.jp）

講演番号：2H04-12
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 10:30～ ミーティングルーム H

果糖ブドウ糖液糖飲料の過飲による非肥満 2 型糖尿病の誘発

Induction of non-obese Type 2 diabetes due to excessive drinking of high fructose corn syrup drinks

○服部 秀美、花井 悠真、大島 佑人、江藤 望（宮崎大農）
○Hidemi Hattori, Yuma Hanai, Yuto Oshima, Nozomu Eto (Miyazaki Univ.)

日本人を含むアジア人は、少食で痩せていても 2 型糖尿病を発症するケースが多い。手軽に摂取できる清涼飲料水には、果糖ブドウ糖液糖（HFCS）などの甘味料が大量に含まれており、この過剰摂取が 2 型糖尿病発症の要因の一つとして考えられている。そこで本研究では、摂取エネルギー量を制限させた条件で、HFCS 飲料の過剰摂取による非肥満 2 型糖尿病の発症について検討した。

3 週齢 ICR 雄マウスを用いた。10% HFCS 水(HFCS 群）及び脱イオン水（コントロール（CR）群）を自由飲水させ、摂取エネルギー量が同じになるよう一般飼料で調整し 8 週間飼育した。開始 7 週間後にグルコース負荷試験（OGTT）を、8 週間後にインスリン負荷試験(ITT)を行った。その試験終了後、肝臓・皮下脂肪・内臓脂肪質量を測定した。

2 群間の体重・肝臓・皮下脂肪・内臓脂肪質量に差はなかった。OGTT において、HFCS 群は CR 群と比較して 15, 30 分後の血糖値が高くなり、30 分後の血中インスリン値は低くなった。ITT において 2 群間に差はなかった。これらの結果から、適切な食事をとらずに HFCS 飲料（清涼飲料水）を過剰摂取すると、肥満にならずともインスリン分泌能低下による 2 型糖尿病を誘発することが示唆された。

Asians, including Japanese, often develop Type 2 diabetes (T2D) even if they are thin and have a smaller diet. Soft drinks contain large amounts of sweeteners such as high-fructose corn syrup (HFCS), and excessive drinking of HFCS drinks is considered to be one of the causes of T2D. The present study investigated the development of non-obese T2D due to excessive drinking of HFCS drinks under the control of caloric energy intake.

Three-week-old male ICR mice were given free access to 10% HFCS water (HFCS group) and deionized water (control (CR) group), and their caloric energy intake was adjusted to be the same for 8 weeks, using a standard rodent diet. The glucose tolerance test (OGTT), and the insulin tolerance test (ITT) were performed. After post-mortem dissection, the liver, subcutaneous fat and epididymal fat masses were measured.

There was no difference in body weight, liver, subcutaneous fat, or epididymal fat masses between the two groups. In the OGTT, the HFCS group had higher blood glucose levels at 15, and 30 minutes and lower blood insulin levels at 30 minutes than the CR group. In the ITT, there was no difference between the two groups. These results suggest that excessive drinking of HFCS drinks, such as contained in soft drinks, without a proper diet induces non-obese T2D due to impaired insulin secretion.

Type 2 diabetes, high-fructose corn syrup, non-obesity

発表責任者：服部秀美（h-hattori@cc.miyazaki-u.ac.jp）

講演番号：2H04-13
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 10:30～ ミーティングルーム H

加齢が社会的ストレス負荷時の生体応答機構に与える影響

Effects of ageing on social stress-induced physiological responses in mice

○田中 航[1]、下位 香代子[2]、榊原 啓之[1] ([1]宮崎大農、[2]静岡県大食)
○ Wataru TANAKA[1], Kayoko SHIMOI[2], Hiroyuki SAKAKIBARA[1] ([1]Univ. Miyazaki, [2]Univ. Shizuoka)

現代社会において，人間関係の複雑化に伴った心理的および社会的なストレス負荷が増大している。故に，予防的観点から，社会的ストレス負荷時の生体応答機構を集約することが重要である。一方，近年，加齢に伴いストレス応答が変化する可能性が示唆されているが，詳細はわかっていない。本研究では，加齢が社会的ストレス負荷時のストレス応答機能に与える影響をマウスを用いて評価した。

成長期（2 か月齢）および更年期（14 か月齢）の雄性 BALB/c マウスに対し，社会的ストレス（対面ストレス）を 2 日あるいは 7 日間負荷した時の生体内変化を，ストレス未負荷群と比較した。

体重は 10 か月齢まで増加し，その後はフラットに達した。ストレス負荷を生体が感知すると，視床下部-下垂体-副腎系が活性化され，その結果，副腎から血中にグルココルチコイド分泌が促進される。血中グルココルチコイド濃度は，成長期において対面ストレス負荷 2 日で有意に上昇し，7 日目で定常状態に戻った。一方，更年期では同様の傾向を示したが，その程度は成長期と比較すると緩やかであった。これらの結果は，社会的ストレスに対する生体応答機構が加齢とともに減弱する可能性を示唆している。現在，成熟期（10 か月齢）と老化期（26 か月齢）を含めた解析を行っている。

Modern human society is considered stressful. During the course of daily life, humans are simultaneously exposed to many types of stressors such as social and physiological stress, and consequently, the incidence of diverse daily stress-related health problems, such as obesity, increases. Recently, physiological responses against stress has been reported to be affected by ageing, although their detail information is not enough. In this study, we evaluated the effects of ageing on social stress-induced physiological responses in mice.

Male BALB/c mice aged at 2 months (growth period) and 14 months (climacteric period) were exposed to social confrontation stress. After 2 days or 7 days, mice were sacrificed and blood corticosterone levels were compared with the control mice.

Blood corticosterone levels were significantly increased at 2 days stress, and the returned at the basal level at 7 days. These phenomena were remarkable at growth period, but not at climacteric period, indicating that stress responses might become weak according to the ageing.

mouse, stress, life stage

講演番号：2H04-14
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 10:30～ ミーティングルーム H

機械学習を利用したマウス聴性脳幹反応における閾値の自動解析

Automatic analysis of thresholds in mouse auditory brainstem response using machine learning

○大池 秀明[1,2]、小谷野 仁[1]([1]農研機構・農情研、[2]農研機構・食品研)
○Hideaki OIKE[1,2], Hitoshi KOYANO[1] ([1]RCAIT/NARO, [2]FRI/NARO)

我々は、これまでに、マウスの加齢性難聴の抑制を指標とした老化予防食品の探索を進めてきた。その測定方法として利用している聴性脳幹反応試験は、頭部表面に設置した電極から、音刺激に対する誘発電位を記録する脳波計測の一種である。ヒト臨床機器においては、一般的に音刺激に対する閾値判定は自動処理されているが、ノイズとシグナルを完全に分けられる方法はなく、判定結果は解析処理に依存する。また、動物試験を含む基礎研究現場においては、研究者が生データを目で見て判定しているケースが多い。これは、ノイズに埋もれたシグナルを検出するという点で優れているが、判定者の主観によって結果が変動することがある。また、大量のデータを処理するには、時間的な制約も多い。そこで、我々は、既存の判定理論と研究者の目視による認識を融合させ、機械学習を利用した自動閾値判定法を構築した。数ステップによる単純なアルゴリズムであるが、既存の約 1300 件のデータに対して閾値の自動判定を行ったところ、目視判定との相関係数は 0.9 を超えた。これにより、目視判定により近い自動判定が可能となることが期待される。改良の余地も含め、これまでの進捗を報告する。

We have been studying anti-aging foods using the mouse model of age-related hearing loss. The auditory brainstem response, which is used as a hearing measurement, is a type of electroencephalogram measurement. In human clinical practice, threshold determination for sound stimulus is automatically processed, but there is no method for completely separating noise and signal, and the determination result depends on analysis methods. Researchers in basic research including animal experiments often make visual judgments from the raw data. This can separate noise and signal better, but the results might vary depending on the subjectivity of the researcher. Moreover, it takes time to process a large amount of data. Therefore, we have constructed an automatic threshold judgment method using machine learning by fusing the existing judgment theory with the visual recognition of researchers. Although it is a simple algorithm with several steps, when the threshold value was automatically judged for the existing data of about 1300 cases, the correlation coefficient with the visual judgment exceeded 0.9. This is expected to enable automatic determination that is closer to visual determination.

auditory brainstem response, hearing, mouse

発表責任者：大池秀明（oike@affrc.go.jp）

講演番号：2H04-15
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 10:30～ ミーティングルーム H

ヒト iPS 細胞からの小腸オルガノイドおよび単層上皮細胞の樹立

Establishment of small intestinal organoids and monolayer intestinal epithelial cells from human iPS cells

○高橋 裕、山内 祥生、佐藤 隆一郎（東大院・農生科・応生化）
○Yu TAKAHASHI, Yoshio YAMAUCHI, Ryuichiro SATO (Dept. of Appl. Biol. Chem., Grad. Sch. of Agr. and Life Sci., Univ. of Tokyo)

オルガノイドは，臓器特異的幹細胞およびその分化細胞から構成される自己増殖性の三次元構造体，すなわち *in vitro* で培養可能なミニ臓器として知られている。従来の株化細胞よりも高度に生理的であり，基礎，応用研究において有用なツールになることが期待されている。

小腸は食品が吸収・代謝される場であるが，これまで *in vitro* での正常な腸管上皮細胞の培養が困難であったため，吸収・代謝機構は未だ不明な点が多く残されている。そのため，我々はヒト小腸オルガノイドを用いた食品科学研究を展開すべく，その培養技術に関する検討を行った。

ヒト小腸オルガノイドは組織から得る方法と iPS 細胞から分化させる方法が報告されているが，前者は手術検体など特別な材料を必要とすることから，後者の方法を採択した。しかし，既報の方法では分化効率が低く，十分な数のオルガノイドを得られなかった。様々な検討の結果，分化初期に Wnt3a/FGF2 を添加することで，分化効率は大きく向上することが判明した。また，小腸オルガノイドは内側が腸管の内腔側となるため，化合物の吸収・代謝を生理的に解析することが困難である。そこで我々はトランズウェル上においてオルガノイドから正常な単層上皮細胞を構築した。本発表では，この上皮細胞の性質について様々な側面から解析を行った結果についても紹介したい。

Organoids are known as self-organizing cell clumps which are composed of tissue-specific stem cells and their differentiated cells in three-dimensional cultures. They are considered to respond more physiologically than conventional established cell lines; therefore, they have been expected to be a significantly useful tool in basic and applied researches.

Nutrients are absorbed and metabolized in the small intestine; however, since continuous culture of intestinal epithelial cells (IECs) *in vitro* is extremely difficult, physiological events occurred in the small intestine have remained unveiled. We thus aimed at establishing small intestinal organoids (SIOs) to reveal the physiological function of IECs.

We worked on the differentiation experiments from human iPSCs into SIOs, and found that the addition of Wnt3a and FGF2 at the initial stage of the differentiation significantly improved differentiation efficiency. We will also introduce the characteristics of established monolayer IECs from SIOs in this oral presentation.

iPS cells, organoid, intestinal epithelial cells

講演番号：2H04-16
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 10:30～ ミーティングルーム H

安価で安定的なヒト小腸オルガノイド培養技術の開発

Development of an unique culture protocol for human small intestinal organoid

○久世 圭太朗、高橋 裕、山内 祥生、佐藤 隆一郎（東大院・農生科・応生化）
○Keitaro KUZE, Yu TAKAHASHI, Yoshio YAMAUCHI, Ryuichiro SATO (Dept. of Appl. Biol. Chem., Grad. Sch. of Agric. and Life Sci., Univ. of Tokyo)

オルガノイドは臓器特異的幹細胞およびその分化細胞が自己増殖する細胞集団であり、ミニ臓器と呼ばれている。オルガノイドの培養はマトリゲルなどの細胞外基質を用いた三次元環境下で行われ、その培地には高価なサイトカインが必要である。小腸オルガノイドは、栄養素の吸収、食品成分に対する応答など、正常な腸管上皮細胞の機能を解明する上で画期的なツールになることが期待される。しかし、その培養には細胞外基質やサイトカインが必要であり、我々はこの課題を解決するため、より安価で安定的な培養法の開発を試みた。

小腸オルガノイド培養に必要な、高価なサイトカインである Wnt-3a、R-spondin1、Noggin、HGF の 4 種類を至適濃度で発現する L 細胞（L-WRNH 細胞）をレンチウイルスベクターシステムにより樹立し、その培養上清（L-WRNH CM）を培地としてオルガノイドを培養することに成功した。また細胞外基質として用いているマトリゲルは、高価であるだけでなく、マウス肉腫由来でありロットごとに構成成分の組成が異なる、などのデメリットがあることから、我々は様々な代替基質を探索した。その結果、より安価であるタイプ I コラーゲンを細胞外基質として用い、ヒト小腸オルガノイドを安定して培養することに成功した。

Organoids, also called as “mini-organs", are self-organizing three-dimensional structures which are composed of tissue specific stem cells and their differentiated cells. The intestinal organoids allow us to investigate physiological functions of small intestine, such as the ways of nutrient absorption and response to food ingredients. However, the current organoid culture protocol requires expensive cytokines and extracellular matrix, which impedes the use of organoids as a research tool, so we worked on the improvement of the culture system.
First, we established mouse L cells which stably express the cytokines Wnt3a, R-spondin1, Noggin, and HGF by lentiviral infection. Using conditioned medium from the cells as culture medium, we were able to continuously culture human intestinal organoids. Second, we searched for inexpensive extracellular matrix that can be a replacement of Matrigel for organoid culture, and found that human intestinal organoids can proliferate in collagen type I gel at a similar rate to those in Matrigel.

organoid, conditioned medium, Matrigel

発表責任者：久世　圭太朗（kuze-keitaro875@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2H04-17
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 10:30～ ミーティングルーム H

株化イヌ由来マスト細胞の大気圧 CO_2 レベルでの培養と脱顆粒活性に関する研究

Degranulation in canine cutaneous mastocytoma cell line cultured under atmospheric CO_2 level.

○西川 洋史（ドルトン東京学園中等部・高等部）
○Hirofumi Nishikawa (Dalton Tokyo Junior and Senior High School)

マスト細胞はアレルギー症状の発現や毒素の中和において重要な役割を担っている。マスト細胞におけるエキソサイトーシス（脱顆粒）は、Fc レセプターやGタンパク質の活性化とその後の細胞内へのカルシウム流入、各種シグナルタンパク質のリン酸化によって引き起こされる。高等学校ではアレルギーおよび細胞内シグナル伝達に関する初歩的な内容を学習するため、マスト細胞は極めてよい実験素材となりうる。しかし、培養に当たって CO_2 インキュベーターの導入コストが障壁となる。そこで本研究では 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES)緩衝系 RPMI-1640 培地を用い、イヌ由来マスト細胞 Canine cutaneous mastocytoma mast cell (CMMC)の培養を試みた。その結果、CMMC は通常の気相培養でも増殖し、イヌ IgG 及びヒト IgG 刺激により脱顆粒することがわかった。CMMC は本来浮遊細胞であるが、接着型細胞を分離することに成功した。接着型 CMMC でも compound 48/80 や mastoparan による脱顆粒を認めた。本結果は培養マスト細胞の教材化の第一歩になるだけではなく、抗アレルギー作用物質のスクリーニング系の簡易化などに寄与するだろう。

【謝辞】本研究は 2020 年度公益財団法人双葉電子記念財団 青少年創造性開発育成事業 の助成を受けた。

Mast cells play a critical role in allergic disease and neutralization of toxins by release various mediators via activation of Fcε receptors, G-protein coupled receptors and Fcγ receptors. Since high school students learn basic concepts about allergic disease including physiological function of mast cells and their intracellular signal transduction, mast cell line can be useful for educational tool to cover these learning contents. However, cell culture devices such as CO_2 incubator are too costly to set up and to maintain in high school. In this experiment we tried to culture canine mastocytoma mast cells (CMMC) in home electric portable warmer by using 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES) without control of CO_2 level. We found that CMMC cultured with HEPES-buffered RPMI-1640 could stably proliferated and release β-glucronidase by stimulation with human-IgG. CMMCs are originally suspension-cultured cells. We selected adherent type CMMC and found the degranulation by compound 48/80, mastoparan. This cell culture method is the first step to use mast cells as educational tool.

mast cell, HEPES, degranulation

発表責任者：西川洋史（cassiopea_ornata@live.jp）

講演番号：2H07-01
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 13:30～ ミーティングルーム H

扁桃体と前障から前頭前野への投射回路による社会行動と社会記憶制御機構

Distinct roles of AMY-mPFC and Cla-mPFC pathways on social behaviors and memory

○谷水 俊之[1,2]、櫻内 華恵[2]、石川 理絵[1,2]、喜田 聡[1,2] ([1]東大院・農・応用生命化学、[2]東農大院・農・バイオ)
○Toshiyuki TANIMIZU[1,2], Kae SAKURAUCHI[2], Rie ISHIKAWA[1,2], Satoshi KIDA[1,2] ([1]Dept. of Applied Biological Chemistry, Univ. of Tokyo, [2]Dep. of Bioscience, Tokyo Univ. of Agriculture)

社会記憶（他者を覚える記憶）は社会生活を営む上で必要不可欠な記憶である。マウスの社会記憶を評価する社会的認知記憶課題では、記憶能力を評価する成体マウスに対して未成熟な幼若マウスを 3 分間提示し、成体マウスが幼若マウスに接触した時間の長さ（探索時間）を測定し、初対面（トレーニング）の時よりも、二度目の対面（テスト）において探索時間が短くなれば幼若マウスを記憶していたと判断する。現在までに、我々はマウスの社会記憶形成に対する前頭前野、海馬、扁桃体、前帯状皮質の必要性を示し、さらに、in silico 解析から前頭前野を中心とする神経回路が社会行動と社会記憶を制御することを予測した(Tanimizu et al., 2017)。本研究は、in silico 解析結果に基づいて前頭前野を中心とした神経ネットワークによる社会行動と社会記憶制御機構を解明することを目的とした。社会行動時あるいは社会記憶形成時にその活性化が示唆された扁桃体から前頭前野への回路(AMY→mPFC)と前障から前頭前野への回路(Cla→mPFC)に着目し、アデノ随伴ウイルスベクターを用いて扁桃体または前障の興奮性ニューロン特異的に光感受性タンパク質アーキロドプシン T（ArchT）を発現させて、トレーニング中あるいはその直後に前頭前野に緑色光を照射して、それぞれの回路を不活性化した影響を解析した。その結果、AMY→mPFC 回路の不活性化は社会行動を抑制したが、社会記憶形成には影響を与えなかったのに対して、Cla→mPFC 回路の不活性化は社会行動に影響を与えなかったものの、社会記憶形成を阻害した。以上の結果から、AMY→mPFC 回路は社会行動を制御し、一方、Cla→mPFC 回路は社会記憶形成を制御することが示唆された。

Social recognition and discrimination support our social behaviors. We have investigated mechanisms for formation of social recognition memory. Previous our study using in silico analyses suggested that medial prefrontal cortex (mPFC) plays central roles in social behaviors and recognition memory. In this study, we tried to clarify roles of neural circuits regulating mPFC in social behavior and memory using optogenetics. We first observed that amygdala (AMY)→mPFC and claustrum (Cla)→mPFC projections are activated when mice show social behaviors or form a social recognition memory, respectively. More importantly, optogenetic inactivation of AMY→mPFC or Cla→mPFC pathway using AAV expressing Archaerhodopsin-T (ArchT, AAV5-CaMKII-ArchT-GFP) impaired social behavior and social recognition memory, respectively. Our findings suggest distinct roles of AMY→mPFC and Cla-mPFC on social behaviors and memory.

memory, social behaviors, social recognition

講演番号：2H07-02
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 13:30～ ミーティングルーム H

必須アミノ酸ヒスチジンによる記憶増強効果

Histidine functions as a memory enhancer

○川嶋 珠生[1]、樺山 音々[2]、小田切 友紀[2]、谷水 俊之[1,2]、石川 理絵[1,2]、喜田 聡[1,2] ([1]東京大農、[2]東農大農)
○Tamau KAWASHIMA[1], Nene KABAYAMA[2], Yuki ODAGIRI[2], Toshiyuki TANIMIZU[1,2], Rie ISHIKAWA[1,2], Satoshi KIDA[1,2] ([1]Univ. of Tokyo, [2]Tokyo Univ. of Agriculture)

ヒスチジンは睡眠、摂食、学習記憶などを制御する神経伝達物質ヒスタミンの前駆体である。そこで、ヒスチジンは脳機能に間接的に影響を及ぼしていると考えられており、実際に学習記憶に対する正の効果が示唆されている。短期記憶は数時間程度の記憶であり、新規遺伝子発現を必要とする固定化を経て安定な長期記憶として貯蔵される。近年、記憶想起後に誘導される再固定化や消去などの記憶プロセスが記憶アップデートを制御することが示唆されている。本研究では、記憶制御に対するヒスチジンの効果とその作用機構の解明を目的として、腹腔内投与と経口投与法を用いて社会的認知記憶に対するヒスチジンの役割の解析を試みた。記憶を評価する成熟野生型マウスを幼若マウスと 1.5 分間対面させて（トレーニング)、この 24 時間後に再び同じ幼若マウスと 1.5 分間対面させて(テスト)、成熟マウスが幼若マウスに鼻先を接触させた時間(investigation time)をそれぞれ測定した。ヒスチジン水溶液をトレーニング 2 時間前に腹腔内投与あるいは 2 時間前から経口投与した場合に、ヒスチジン投与群ではトレーニングに比較してテストにおいて有意な investigation time の減少が観察され、 一方、溶媒投与群ではこの低下が観察されなかった。従って、ヒスチジン投与群にのみ社会的認知記憶が観察され、ヒスチジン投与により社会的認知記憶の形成が強化されることが示唆された。

Histidine is a precursor of neurotransmitter histamine that plays central roles in regulation of sleep, feeding behaviors and learning/memory. Therefore, histidine indirectly regulates brain function. Memory consolidation is a process to stabilize labile memory through new gene expression, generating long-term memory. To update the consolidated memory, retrieved memory are modified through memory processes including reconsolidation, extinction and forgetting. In this study, we are trying to understand effects of histidine on learning/memory processes and mechanisms for regulation of memory processes by histidine. To do this, we examined effects of systemic and oral administration of histidine on social recognition memory. We observed that adult mice systemically or orally administrated histidine 2 hours before training, in which the mice were exposed to a juvenile mouse for 1.5 min, showed social recognition memory although mice administrated vehicle failed to show this memory. Our results suggest that dietary histidine enhances formation of social recognition memory and functions as a memory enhancer.

memory, consolidation, histidine

講演番号：2H07-03
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 13:30～ ミーティングルーム H

恐怖記憶制御プロセスに対する青斑核の役割の解析

Understanding roles of the locus coeruleus in regulation of contextual fear memory

○在原 悠[1,2]、喜田 聡[1,2] ([1]東農大院・農・バイオ、[2]東大院・農・応用生命科学)
○Yu ARIHARA[1,2], Satoshi KIDA[1,2] ([1]Dept. of Bioscience, Tokyo Univ. of Agriculture, [2]Dept. of Applied Biological Chemistry, Univ. of Tokyo)

恐怖記憶は固定化を経て不安定な記憶から安定な長期記憶に変換される。さらに、固定化された恐怖記憶は想起されると再び不安定な記憶に戻り、再固定化を経て再び安定な記憶に戻る。一方、想起される時間が長くなると、恐怖反応を減弱する恐怖記憶消去が誘導される。これら固定化、再固定化、消去に共通して新規遺伝子発現が必要である。青斑核はノルアドレナリン作動性の神経核であり、広範な記憶制御脳領域に神経投射している。近年の報告から、青斑核から海馬へ投射するニューロンが恐怖条件づけ文脈記憶制御に関わることが示唆されている。しかし、恐怖記憶固定化、想起、再固定化、消去をはじめとする恐怖記憶制御プロセス群に対する青斑核の役割とその制御機構は解明されていない。そこで本研究では、恐怖条件づけ文脈記憶制御に対する青斑核の役割を解明することを試みた。チャンバー内で電気ショックを受ける恐怖文脈条件付け直後に、脳内局所注入法を用いてマウスの青斑核にタンパク質合成阻害剤アニソマイシン（ANI）またはその溶媒を微量注入した。この 24 時間後にマウスを再びチャンバーに暴露し、すくみ（恐怖）反応を示した時間の長さを測定した（テスト）。その結果、ANI 注入群は溶媒注入群と比較してテストにおいて有意に低いすくみ反応を示し、青斑核における遺伝子発現が恐怖記憶固定化に必要であることが示唆された。現在、他の記憶プロセス群に対する青斑核における遺伝子発現の役割を解析しており、これらの結果をまとめて報告する。

Memory consolidation is a process to stabilize short-term labile memory, generating long-term memory, whereas memory reconsolidation is a process to re-stabilize retrieved memory. A critical biochemical feature of memory consolidation and reconsolidation is a requirement of new gene expression. The locus coeruleus (LC) is a nucleus composed of noradrenergic neurons projecting to the hippocampus. Recent studies suggest that LC→hippocampal projection plays functional roles in fear memory regulation. In this study, we tried to understand roles of LC in memory processes of contextual fear memory at the systems level. To do this, mice were trained with a single footshock and micro-infused a protein synthesis inhibitor anisomycin into the LC immediately after the training. Twenty-four hrs later, mice were assessed freezing responses by the re-exposure to the training context for 5 min (test). Mice received micro-infusion of anisomycin into LC showed significantly less freezing at the test compared to control group. These observations suggest that gene expression activation in the LC is required for consolidation of contextual fear memory.

locus coeruleus, fear conditioning, fear memory

講演番号：2H07-04
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 13:30～ ミーティングルーム H

海馬の社会忌避記憶エングラムの光遺伝学的抑制は PTSD 様行動を改善する

Optogenetic inactivation of social avoidance memory engram improves PTSD-like behavior

○武生 優花[1,2]、石川 理絵[1,2]、喜田 聡[1,2] ([1]東大院・農生科・応生化、[2]東農大院・農・バイオ)
○Yuka TAKYU[1,2], Rie ISHIKAWA[1,2], Satoshi KIDA[1,2] ([1]Dep. of Applied Biological Chem, Univ. of Tokyo, [2]Dep. of Bioscience, Tokyo Univ. of Agriculture)

心的外傷後ストレス障害(PTSD)は、トラウマ体験の記憶（トラウマ記憶）を原因とする精神疾患である。マウスの社会的敗北(SD)ストレス課題では、攻撃性の高いマウスに繰り返し攻撃を受けることで、この攻撃マウスに対する社会忌避行動のみならず、慢性的な不安行動の亢進が観察される。我々はこの課題が PTSD モデルであるとの仮説を立て、この仮説を検討するため、記憶エングラムの観点から攻撃マウスに対する社会忌避（トラウマ）記憶と不安行動亢進の連結性を解析した。攻撃性の高い ICR 雄マウスからの攻撃を 10 分間受けさせた際に（SD 処置)、Mayford らによって開発された c-fos タグシステムを用いて光感受性タンパク質アーキロドプシン T によりマウス海馬の社会忌避記憶痕跡細胞（エングラム）をラベルした。その後、エングラムラベルを行わずに 9 日間以上連続して SD 処置を受けさせた。全 SD 処置終了後に、高架式ゼロ迷路課題を用いて不安行動を評価した結果、光操作を行わない場合には、SD 処置マウスに不安行動が観察されたのに対して、光操作により海馬エングラムを不活性化させた場合にはこの不安行動の低下が観察された。以上の結果は、社会忌避記憶エングラムを不活化すると不安行動までもが改善することを示し、この記憶エングラムと不安行動の連結性を強く示唆した。この結果は、SD 課題はトラウマ記憶を原因として PTSD 様症状を生じさせる PTSD モデルであるとの我々の仮説を支持するものである。

Post-traumatic stress disorder (PTSD) is a mental disorder associated with traumatic memory. In the social defeat (SD) stress task, repeated exposures to SD stress by aggressor mice induce social avoidance behavior to the aggressor and anxiety-like behavior in mice. We hypothesized that chronic anxiety-like behaviors in this paradigm is associated with traumatic social avoidance memory. To examine this hypothesis, we tried to identify hippocampal engram of social avoidance memory and examine effects of optogenetic inactivation of this engram on anxiety-like behavior using c-fos-tag system. To label the memory engram with archaerhodopsin-T, c-fos:tTA mice were exposed to an aggressor mouse for 10 min and attacked by this mouse (SD treatment). Following SD treatments for 10 days, these SD-treated mice showed anxiety-like behavior. Interestingly, optogenetic inactivation of the hippocampal memory engram improved this anxiety-like behavior. Our observations suggest that hippocampal traumatic social memory engram is associated with anxiety-like behavior and support our hypothesis that SD paradigm is a mouse PTSD model.

engram, Social defeat, Elevated zero maze

講演番号：2H07-05
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 13:30～ ミーティングルーム H

ニコチン依存性場所嗜好記憶課題を用いた薬物依存性記憶エングラムの同定

Identification of drug addiction memory engram in nicotine-conditioned place preference paradigm

○海野 匡紀[1,2]、喜田 聡[2]、石川 理絵[2] ([1]東農大農、[2]東大農)
○Masanori UNNO[1,2], Satoshi KIDA[2], Rie ISHIKAWA[2] ([1]Tokyo Univ. of Agriculture, [2]Tokyo Univ.)

薬物を無条件刺激とする条件付き場所嗜好性課題は齧歯類の薬物依存性記憶モデルの一つであり、薬物と場所（条件刺激）の連合記憶である薬物依存性場所嗜好（Conditioned place preference; CPP）記憶を形成させる。一方、記憶エングラムは、記憶の形成と想起時に活性化する記憶貯蔵を担う記憶痕跡の実態と考えられている。本研究では、CPP 記憶の制御基盤を解明する端緒として、c-fos タグシステムを用いてニコチン依存性 CPP 記憶エングラムの同定を試みた。ヒストン H2B と融合した緑色蛍光タンパク質（H2BGFP）を c-fos プロモーター下で発現するマウスを白箱と黒箱が連結された装置へ馴化させ、その後、８日間連続でニコチン投与後に白箱、また、溶媒投与後に黒箱にそれぞれ曝露した（条件付け）。条件付け最終日に、ニコチン投与後の白箱曝露時に H2BGFP 発現を誘導し、薬物記憶形成時に活性化するニューロンをラベルした、さらに、条件付け終了 2 日後に白箱への再曝露後、すなわち、記憶想起時に活性化されるニューロンにおける初期応答遺伝子 c-fos 発現を解析し、H2BGFP と c-fos との二重陽性細胞を記憶エングラムとして評価した。その結果、白箱曝露時に溶媒を投与した対照群に比べてニコチンを投与した群では、側坐核と海馬において二重陽性細胞が有意に多く観察され、側坐核と海馬にニコチン依存性 CPP 記憶エングラムが存在することが示唆された。

Conditioned place preference (CPP) is one of models of drug addiction memory in rodents. In this study, to understand biological basis of CPP memory, we tried to identify nicotine-induced CPP memory engrams using c-fos-tag system. To do this, we used transgenic mice that inducibly express Histone 2B-GFP fusion protein (H2B). Following the habituation to the conditioned chamber consisting of the white and black boxes, mice were exposed to the white and black boxes after systemic injection of nicotine (NIC) or vehicle, respectively (Conditioning). Memory engrams were labeled with H2B by exposure to the white box with NIC injection (NIC group) at the last days of conditioning. Control group received vehicle in the white box during Conditioning (VEH group). Two days later, the mice were re-exposed to the white box and then following c-fos expression in response to CPP memory retrieval was assessed. NIC group showed significantly more double positive cells in the NAc and hippocampus compared to VEH group, suggesting that CPP memory engrams activated during memory formation and retrieval were observed in the NAc and hippocampus.

CPP, engram, nicotine

講演番号：2H07-06
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 13:30～ ミーティングルーム H

アデノシン A2a 受容体が海馬依存性記憶想起を制御する

Adenosine A2a receptor regulates hippocampus-dependent memory retrieval

○渡邊 亮介[1,2]、長谷川 俊介[1]、喜田 聡[1,2] ([1]東農大院・農・バイオ、[2]東大院・農・応用生命化学)
○Ryosuke WATANABE[1,2], Shunsuke HASEGAWA[1], Satoshi KIDA[1,2] ([1]Dept. of Bioscience, Tokyo Univ. of Agriculture, [2]Dept. of Applied Biological Chemistry, Univ. of Tokyo)

生物時計は学習・記憶能力を中心とする認知機能制御すると考えられている。我々は学習・記憶能力に対する生物時計の役割を明らかにするために、生物時計を構成する中心的な時計遺伝子である BMAL1 に着目し、前脳特異的にドミナントネガティブ型 BMAL1（dnBMAL1）を発現する遺伝子改変マウス（dnBMAL1 マウス）を作製し、この変異型マウスの学習・記憶能力の解析を進めてきた。その結果、この変異型マウスは時間帯依存的（明期開始後 10 時間; ZT10）に海馬依存性記憶の想起障害を示したことから、海馬依存性記憶の想起が海馬生物時計によるサーカディアン制御を受けることが強く示唆された。さらに、dnBMAL1 マウス海馬では、cAMP 情報伝達経路関連遺伝子群の発現の異常が示され、アデニル酸シクラーゼ 1 の mRNA 量、cAMP 量も低下していることが示された (Nature Commun., 2019)。一方、G タンパク質共役型受容体であるアデノシン A2a 受容体（A2aR）はアデニル酸シクラーゼを活性化することで cAMP 産生を促進することが知られている。本研究では記憶想起に対するアデノシン A2aR の役割を解析することを目的として、海馬依存性記憶課題である社会的認知記憶課題を用いた行動薬理学的解析を行った。アデノシン A2aR アンタゴニスト SCH442416 をマウスに腹腔内投与した結果、明期開始 10 時間後（ZT10）では社会的認知記憶の想起障害が観察され、一方、ZT4 ではこの想起障害は観察されなかった。以上の結果より、アデノシン A2aR が時間帯特異的な海馬依存性記憶想起制御に貢献していることが示唆された。

Cognitive performance in people varies according to time-of-day, with memory retrieval declining in the late afternoon-early evening. We have investigated roles of circadian clock in memory performance and shown that hippocampal circadian clock positively regulates memory retrieval through activation of signal transduction of cAMP→PKA→Phosphorylation of AMPA receptor at S845. In this study, we examined roles of adenosine A2a receptor (A2aR) in memory retrieval since this receptor is a G protein-coupled receptor and promotes cAMP production by activating adenylate cyclase. To do this, we examined effects of systemic injection of A2aR antagonist SCH442416 on retrieval of social recognition memory in WT mice, and found that inactivation of A2aR impaired memory retrieval 10 hours following light on (Zeitgeber Time, ZT10), but not ZT4, in a dose-dependent manner. Our finding suggests that A2aR contributes to regulation of hippocampus-dependent memory retrieval in a time-dependent manner.

memory, A2aR, circadian

講演番号：2H07-07
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 13:30～ ミーティングルーム H

Aβ42 海馬注入アルツハイマー型認知症モデルマウスにおける時間帯依存的記憶障害

Alzheimer's disease mouse model micro-infused Aβ42 into the dorsal hippocampus shows time-of-day dependent memory impairment

○ボーグ ジェームス、喜田 聡（東大院・農・応用生命化学）
○James BORG, Satoshi KIDA (Dept. of Applied Biological Chemistry, Univ. of Tokyo)

アルツハイマー型認知症（AD）では認知機能が低下する時間帯が存在することが広く知られているが、AD における記憶障害の概日変化の実態は不明である。我々は学習・記憶能力に対する生物時計の役割の解析を進めてきた。前脳特異的にドミナントネガティブ型 BMAL1(dnBMAL1)を発現する遺伝子改変マウス(dnBMAL1 マウス)を作製し、この変異型マウスの学習・記憶能力の解析を進めた結果、この変異型マウスは時間帯依存的（明期開始後 10 時間; ZT10）に海馬依存性記憶の想起障害を示すこと、一方、野生型マウスも ZT10 で弱い記憶想起障害を示すことを明らかにした。以上より、海馬依存性記憶の想起が海馬生物時計によるサーカディアン制御を受けると結論した（Nature Commun., 2019）。本研究では、アルツハイマー型認知症における記憶障害の概日変化とそのメカニズムを解明する端緒として、アミロイドβ42(Aβ42)を海馬に局所注入した AD モデルマウスにおける社会的認知記憶障害の概日変化を解析した。その結果、Aβ42 注入マウスでは学習強度を強めた場合には ZT10 においてのみ記憶障害が観察され、一方、学習強度を弱めると ZT4 と ZT10 の両方で記憶障害が観察された。従って、Aβ42 注入マウスは ZT10 でより重篤な記憶障害を示すこと、すなわち、時間帯依存的な記憶障害を示すことが強く示唆された。

Alzheimer's Disease(AD) has been known to show time-dependent declines of cognitive performance. Additionally, cognitive performance in humans varies according to time-of-day, with memory retrieval declining in the late afternoon-early evening. We have shown that mice show circadian regulation of memory retrieval and that hippocampal circadian clock positively regulates memory retrieval (Nature Commun., 2019). To understand the signatures and mechanisms of memory deficits in AD, we have examined time-dependent memory performance in AD model mice micro-infused Amyloid β42(Aβ42) into the dorsal hippocampus (Aβ42-injected mice) using hippocampus-dependent social recognition paradigm. Aβ42-injected mice showed impairments of social recognition memory when they were trained under weak training condition at ZT 4 or 10 and tested at 24hrs after training. However, Aβ42-injected mice showed memory impairment only at ZT10 when trained under a strong training condition. These results indicate that Aβ42-injected mice exhibit more severe impairments of social recognition memory at ZT10 compared to ZT4, raising the possibility that these AD model mice show time-of-day dependent memory impairment.

Alzheimer's Disease, Memory, Circadian Rhythm

講演番号：2H07-08
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 13:30～ ミーティングルーム H

MIG12 は LXR 活性化による ACC ポリマー化亢進に関与する

MIG12 is involved in the LXR activation-mediated induction of the polymerization of mammalian acetyl-CoA carboxylase

和泉 彬子[1]、平口 遥香[1]、小高 愛未[2]、池内 江美奈[1]、成田 淳子[1]、小林 里奈[3]、松本 雄宇[2]、鈴木 司[2]、山本 祐司[2,3]、佐藤 隆一郎[1]、○井上 順[2,3]([1]東大院・農生科・応生化、[2]東農大・応生科・農化、[3]東農大院・応生科・農化)
Akiko IZUMI[1], Haruka HIRAGUCHI[1], Manami KODAKA[2], Emina IKEUCHI[1], Junko NARITA[1], Rina KOBAYASHI[3], Yu MATSUMOTO[2], Tsukasa SUZUKI[2], Yuji YAMAMOTO[2,3], Ryuichiro SATO[1], ○Jun INOUE[2,3] ([1]Univ. of Tokyo, Grad. Sch. of Agr. and Life Sci., [2]Tokyo Univ. of Agric., [3]Tokyo Univ. of Agric., Grad. Sch. of Agric. Chem.)

【背景と目的】LXR (Liver X Receptor)は脂質代謝関連遺伝子の転写制御に関わる核内受容体である。我々は LXR の新規標的遺伝子として MIG12 を同定し、MIG12 が脂肪酸・トリグリセリド合成に関与することを示してきた[1)]。ACC (Acetyl-CoA Carboxylase)はポリマー化により活性化する脂肪酸合成の律速酵素である 。今回我々は、LXR 活性化時に ACC のポリマー化が上昇するか、さらにその上昇に MIG12 が関与するかについて検討を行った。さらに MIG12 と ACC の相互作用に必須な領域の同定を行った。
【方法】肝がん由来 HepG2 細胞に LXR 合成リガンドである T0901317 を 24 時間処理したサンプルを BN-PAGE に供し、その後 ACC 抗体を用いた Western blot を行った。また、siMIG12 を導入することで MIG12 をノックダウンした条件下で T0901317 処理を行い、同様に検出した。FLAG タグを連結した ACC の部分欠失体と His タグを連結した MIG12（野生型およびロイシンジッパー変異体）の発現プラスミドを HEK293 細胞にコトランスフェクションし、FLAG 抗体で免疫沈降後、His 抗体で検出を行うことで ACC と MIG12 の結合領域の検討を行った。
【結果と考察】HepG2 細胞に LXR リガンドを処理することで ACC ポリマー化が促進され、MIG12 のノックダウンによってその作用が消失した。これは LXR 活性化による ACC ポリマー化促進には MIG12 が関与していることを示している。また、ACC の N 末端ドメイン（BT ドメイン）の欠失や、MIG12 ロイシンジッパー変異体では ACC と MIG12 の結合が減弱しており、結合に重要なそれぞれの領域を同定できた。現在、MIG12 と ACC の結合が ACC の翻訳後修飾（リン酸化）に及ぼす影響について解析を行っている。1) J. Inoue et al. *Mol.Endocrinol.* **25**. 995-1005 (2011)

Here, we show that LXR's activation stimulates ACC polymerization in HepG2 cells by increasing the expression of MIG12. A knockdown of MIG12 abrogated the stimulation completely. The ACC's BT domain was found necessary for binding to MIG12. Moreover, the mutations of MIG12's leucine-zipper domain reduced the interaction between MIG12 and ACC, thus decreasing the MIG12's capacity to stimulate ACC polymerization. These results indicate that LXR's activation stimulates lipogenesis not only through the induction of the genes encoding lipogenic enzymes but also through MIG12's stimulation of ACC polymerization.

Fatty acids, ACC, LXR

発表責任者：井上　順（ji206785@nodai.ac.jp）

講演番号：2H07-09
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 13:30～ ミーティングルーム H

腸管粘膜での IgA 分泌における転写抑制因子 Bach1 の機能解析

Involvement of transcriptional repressor Bach1 in intestinal IgA secretion in mice

○濵田 理久[1]、谷川 潤[1]、武藤 哲彦[2]、五十嵐 和彦[2]、髙木 智久[3]、内藤 裕二[3]、東村 泰希[1,3]（[1]石川県大・生資環、[2]東北大院・医、[3]京府医院・医）
○ Riku HAMADA[1], Jun TANIKAWA[1], Akihiko MUTO[2], Kazuhiko IGARASHI[2], Tomohisa TAKAGI[3], Yuji NAITO[3], Yasuki HIGASHIMURA[1,3] ([1]Ishikawa Pref. Univ., [2]Tohoku Univ., [3]Kyoto Pref. Univ. of Med.)

免疫グロブリン A（IgA）は腸管粘膜免疫における主要因子であり、腸管リンパ組織であるパイエル板で主に産生される。腸管管腔内へ分泌された IgA はウイルスや細菌などの病原体と結合することでこれら病原体の生体内への侵入防御、食細胞の貪食能強化に寄与する。従って、IgA の質的・量的強化は免疫力低下に伴う疾病予防に対して貢献することが期待される。BTB domain and CNC homology 1（Bach1）はヘム結合性の転写抑制因子であり、グロビン遺伝子や酸化ストレス応答系に関わる遺伝子の発現制御を担っている。Bach1 は普遍的に発現する因子であるが、腸管生理機能に及ぼす影響については未だ明らかでない。本研究では、遺伝子改変マウスを用いて、Bach1 が腸管生理機能に及ぼす影響について解析をおこなった。その結果、Bach1 遺伝子の欠損に伴い、パイエル板の増加・肥大および腸管粘膜での IgA 産生が亢進することを見出した。また、パイエル板における IgA 産生細胞数の増加も観察された。一方で、便中 IgA 量を測定した結果、野生型（WT）および Bach1 欠損マウス（Bach1KO）の間で有意な変化は観察されなかった。即ち、粘膜中に存在する IgA が管腔内へと適切に分泌されていない可能性が示唆された。管腔内への IgA 分泌は、腸管上皮細胞に発現する多量体免疫グロブリン受容体（pIgR）を介しておこなわれる。WT および Bach1KO より大腸組織を摘出し、定量的 RT-PCR 法およびウエスタンブロット法を用いて pIgR の発現レベルを解析した。その結果、mRNA およびタンパク質レベルの両方において、Bach1 遺伝子の欠損に伴う pIgR の発現低下が観察された。以上の結果より、Bach1KO の腸管組織では IgA 産生は亢進するが、管腔内への適切な分泌には至らないことが示唆された。詳細な分子機序に関しては現在解析中である。

Immunoglobulin A (IgA) produced in small intestine plays a crucial role in maintaining intestinal homeostasis. In the intestinal mucosa, IgA production induced in the gut-associated lymphoid tissue (GALT) such as Peyer's patch. IgA protect host immunity against pathogen infection by binding virus or bacteria in intestine. BTB domain and CNC homolog1 (Bach1) is a transcription repressor, which are mainly involved in the regulation of antioxidative pathway. Although Bach1 is ubiquitously expressed genes, its effect on intestinal physiology is still unclear. In this study, we investigated the function of Bach1 in IgA-mediated intestinal mucosal immunity using Bach1-deficient mice.

IgA, Bach1, mucosal immunology

講演番号：2H07-10
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 13:30～ ミーティングルーム H

転写抑制因子 Bach1 の欠損は大腸上皮において細胞増殖を促進する。

Bach1-deficiency promotes colonic epithelial cell proliferation in mice

○谷川 潤[1]、水島 かつら[2]、平井 泰子[2]、武藤 哲彦[3]、五十嵐 和彦[3]、髙木 智久[2]、内藤 裕二[2]、東村 泰希[1,2] ([1]石川県大・生資環、[2]京府医院・医、[3]東北大院・医)
○ Jun TANIKAWA[1], Katsura MIZUSHIMA[2], Yasuko HIRAI[2], Akihiko MUTO[3], Kazuhiko IGARASHI[3], Tomohisa TAKAGI[2], Yuji NAITO[2], Yasuki HIGASHIMURA[1,2] ([1]Ishikawa Pref. Univ., [2]Kyoto Pref. Univ, [3]Tohoku Univ)

【目的】BTB domain and CNC homology 1（Bach1）は酸化ストレス応答に関与する転写抑制因子であり、腸管における Bach1 の役割は未だ明らかでない。本研究では Bach1 欠損マウス（Bach1KO）を用いて、腸管における Bach1 の生理的及び病態生理学意義について明らかにすることを目的とした。
【方法】野生型マウス（C57BL/6J; WT）及び Bach1KO より腸管組織を摘出し、絨毛長および陰窩長等の組織学的解析を実施した。免疫組織染色法を用いて、大腸組織における Bach1 及び細胞増殖マーカーである Ki-67 の発現を評価した。同様のマウスから摘出した大腸組織の上皮層を剥離し、DNA マイクロアレイによる網羅的な遺伝子発現解析を行った。1%デキストラン硫酸ナトリウム水溶液（DSS; 分子量 36,000~50,000）の自由飲水により実験大腸炎モデルを作製し、組織学的及び生化学的手法により炎症レベルを評価した。
【結果・考察】組織学的解析の結果、Bach1KO では WT と比較して、大腸における陰窩長の顕著な伸長が観察された。また、Bach1 遺伝子の欠損に伴い、大腸陰窩における Ki-67 陽性細胞数が有意に増加した。免疫組織染色法を用いて、大腸組織における Bach1 の発現局在を解析した結果、Bach1 は大腸上皮層に強く発現することが判明した。大腸上皮層を用いた網羅的な遺伝子発現解析の結果、Bach1KO では WT と比較して、細胞増殖に関与する遺伝子である *Wnt family member 5A*（*Wnt5a*）の発現が有意に高値を示した。また、実験大腸モデルを用いた *in vivo* 解析の結果、DSS 投与により惹起された腸管長の縮小や、病態スコアおよび炎症性サイトカイン発現の上昇は Bach1KO において有意に抑制された。以上の結果より、Bach1 の発現制御は細胞増殖に伴う創傷治癒を起点とした大腸炎予防における新たな分子標的となることが示唆された。

Bach1 is a transcription repressor, which are mainly involved in the regulation of antioxidative pathway. Although Bach1 is ubiquitously expressed genes, its effect on intestinal physiology is still unclear. The aim of this study is to clarify the physiological and pathophysiological function of Bach1 in the intestinal tract using Bach1KO. In Bach1KO, a marked increasing in crypt length and the number of Ki-67-positive cells were observed in the colon compared to that of WT. With regard to the pathophysiological event, DSS administration induced a reduction in colon length and increases in pathological score and inflammatory cytokine expression. The inductions of colitis features were suppressed in Bach1KO.

Bach1, Cell proliferation, Colitis

講演番号：2H07-11
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 13:30～ ミーティングルーム H

転写抑制因子 Bach1 の欠損に伴う大腸ムチンの性状変化について

Effect of Bach1 deficiency on colonic mucus secretion and its properties in mice

○米澤 明莉[1]、谷川 潤[1]、水島 かつら[3]、平井 泰子[3]、武藤 哲彦[2]、五十嵐 和彦[2]、髙木 智久[3]、内藤 裕二[3]、東村 泰希[1,3]([1]石川県大・生資環、[2]東北大院・医、[3]京府医院・医)
○ Akari YONEZAWA[1], Jun TANIKAWA[1], Katsura MIZUSHIMA[3], Yasuko HIRAI[3], Akihiko MUTO[2], Kazuhiko IGARASHI[2], Tomohisa TAKAGI[3], Yuji NAITO[3], Yasuki HIGASHIMURA[1,3] ([1]Ishikawa Pref. Univ., [2]Tohoku Univ., [3]Kyoto Pref. Univ. of Med)

腸管内壁は糖タンパク質であるムチンを主成分とする粘液で覆われており、腸管腔内に存在する有害な微生物などから上皮細胞を保護するバリア層として機能している。即ち生体防御の観点より、粘液層を強固に保つことは腸組織の恒常性維持において極めて重要である。BTB domain and CNC homology 1（Bach1）はヘム結合性の転写抑制因子であり、グロビン遺伝子や酸化ストレス応答系に関わる遺伝子の発現制御を担っている。Bach1 は普遍的に発現する因子であるが、腸管生理機能に及ぼす影響については未だ明らかでない。本研究では、Bach1 欠損マウス（Bach1KO）を用いて、腸管生理機能における Bach1 の機能解析を実施した。

組織学的解析の結果、Bach1 遺伝子の欠損に伴い腸管、特に大腸において、陰窩長の有意な伸長が観察された。中でも、粘液産生細胞である杯細胞が顕著に増加していたことから、Bach1KO では粘液分泌を介したバリア機能が強化されることが示唆された。続いて、野生型マウス（WT）および Bach1KO より採取した糞便よりムチン画分を粗抽出し、過ヨウ素酸シッフ（PAS）染色法を用いた糖質成分の定量解析を実施した。その結果、組織学的解析より得られた結果と同様に、Bach1 遺伝子の欠損に伴う糖質成分の有意な増加が観察された。しかし、同様の糞便試料を用いて、糖鎖還元末端蛍光ラベル法を用いて便中ムチン含量を測定した結果、WT および Bach1KO の間で有意な変化は認められなかった。続いて、同様のムチン画分を SDS-PAGE で分離後、PAS 染色による可視化を実施した結果、WT と Bach1KO では異なる電気泳動パターンを呈した。以上の結果より、ムチン中における糖鎖還元末端数には変化は認められないものの、PAS 陽性成分は有意に増加していることから、Bach1KO ではムチンの糖鎖修飾様式が変化している可能性が示唆された。詳細な分子機序に関しては現在解析中である。

Intestinal mucus functions as a barrier that protects epithelial cells from harmful factors such as bacteria and virus existing in the intestinal lumen. BTB domain and CNC homolog1 (Bach1) is a transcription repressor, which are mainly involved in the regulation of antioxidative pathway. Although Bach1 is ubiquitously expressed genes, its effect on intestinal physiology is still unclear. In this study, we investigated the function of Bach1 in intestinal physiology, especially mucus secretion and its properties, using Bach1-deficient mice.

Bach1, mucin, glycosylation

講演番号：2H07-12
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 13:30～ ミーティングルーム H

筋萎縮モデル・骨格筋特異的 FOXO1 過剰発現マウスの血液メタボローム解析；カルノシン量の変化

Metabolomic analysis in blood of transgenic mice with skeletal muscle specific overexpression of FOXO1; change in carnosine level

○水谷 彩子、中井 志帆、大藪 葵、亀井 康富（京都府立大生命環境）
○Sako MIZUTANI, Shiho NAKAI, Mamoru OYABU, Yasutomi KAMEI (Kyoto Prefectural Univ.)

FOXO1 は飢餓や不活動によって発現が増加する転写因子であり、FOXO1 を骨格筋特異的に過剰発現させたマウス(FOXO1-Tg マウス)では顕著な筋萎縮が引き起こされる。そのため、FOXO1 の発現増加によって産生・分泌が促進される物質は骨格筋萎縮のマーカーになると考えられる。本研究では、CE-TOFMS を用いて FOXO1-Tg マウスの血液の代謝産物を網羅的に解析し、FOXO1 の発現増加により変化する骨格筋萎縮バイオマーカーを探索した。CE-TOFMS の結果、FOXO1-Tg マウスの血液においてカルノシンが著しく増加していた。一方で、FOXO1-Tg マウスの骨格筋において HPLC を用いてアミノ酸の測定を行ったところ、野生型コントロールマウスと比較してカルノシン量は大きく減少した。カルノシンはβ-アラニンと L-ヒスチジンが結合したジペプチドであり、骨格筋で合成され、カルノシントランスポーターによって輸送される。FOXO1-Tg マウスの骨格筋においてカルノシン関連遺伝子の発現解析を行ったところ、FOXO1 によるカルノシン合成酵素の発現に変化はなかったが、カルノシントランスポーターの発現が増加した。以上の結果から、骨格筋に存在するカルノシンが FOXO1 の発現増加によりカルノシントランスポーターを介して血液中に分泌されたと考えられ、カルノシンが骨格筋萎縮バイオマーカーとなる可能性が示唆された。

FOXO1 is a transcription factor whose expression is increased by starvation and inactivity. FOXO1 transgenic (FOXO1-Tg) mice with skeletal muscle specific overexpression of FOXO1 demonstrated significant muscle atrophy. We have conducted comprehensive analysis of blood metabolites in FOXO1-Tg mice using CE-TOFMS. As a result, carnosine was the most increased metabolite in the blood of FOXO1-Tg mice compared with wild type (WT) mice. When amino acids were measured, the amount of carnosine in the skeletal muscle of FOXO1-Tg mice was significantly reduced compared with WT mice. Carnosine is a dipeptide, composed of β-alanine and L-histidine. Carnosine is synthesized in skeletal muscle and transported by carnosine transporter. Expression of carnosine synthase was not changed, while expression of carnosine transporter was increased in FOXO1 overexpressed models. From these results, we considered that carnosine synthesized in skeletal muscle is secreted into the blood via the carnosine transporter by overexpression of FOXO1. It is possible that carnosine is a biomarker of skeletal muscle atrophy.

FOXO1, carnosine, muscle atrophy

講演番号：2H07-13
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 13:30～ ミーティングルーム H

哺乳類細胞を用いた接着斑タンパク質ビネキシンαの精製系構築

Purification of Focal Adhesion Protein, Vinexin α using Mammalian Cells

○鎌田 一希、木村 泰久、木岡 紀幸（京大院農）
○Kazuki KAMADA, Yasuhisa KIMURA, Noriyuki KIOKA (Kyoto Univ.)

動物細胞を囲むように存在している細胞外マトリックス(ECM)は、細胞の増殖や分化等を調節している。ECM による細胞機能の調節は、細胞−ECM 間接着部位に形成されるタンパク質複合体、接着斑により仲介される。接着斑タンパク質ビネキシン α は硬い ECM 上で別の接着斑タンパク質ビンキュリンと結合し、硬さに応じた細胞遊走にも必要な因子であるが、ビネキシン α は大腸菌内で発現させると分解されやすく、また可溶性が低く精製が困難であった。そこで本研究は、GFP を融合したビネキシン αΔac (N 末端側欠損変異体) を哺乳類細胞で発現させ、その発現・精製条件確立を目的とした。

まず、GFP−ビネキシン αΔac をヒト胎児腎臓由来 HEK293 細胞に一過的に発現させ、様々な条件の溶液に可溶化した。その結果 GFP−ビネキシン αΔac は、塩濃度 1 M、界面活性剤 1% CHAPS の条件で最も高い可溶性を示した。続いて、精製用 GST タグを融合した GST−GFP−ビネキシン αΔac を FreeStyle293 浮遊細胞に一過的に発現させ、バッチ法による精製を試みた。グルタチオンビーズとの結合時間を延長することで、従来条件より溶出量が約 3.7 倍に増加した。さらに、HRV 3C プロテアーゼを用いて GST を切断し、ゲル濾過クロマトグラフィーにてピーク分画することで、100 mL 培養液から、純度 70%で 12 μg の GFP−ビネキシン αΔac が精製された。以上より、GFP−ビネキシン αΔac の哺乳類細胞を用いた発現・精製方法を確立した。今後は精製タンパク質を用いて、ビンキュリンや細胞膜脂質との詳細な結合解析を行う予定である。

Cells sense extracellular matrix (ECM) environment through cell-ECM contact sites called focal adhesions, which consist of hundreds of protein complexes. Recently, it has been revealed that the focal adhesion protein, vinexin α is important for sensing ECM stiffness. Although it is important to examine the property of purified vinexin α *in vitro*, there were problems to express and purify vinexin α in *E. coli* because of its low solubility. Therefore, we tried to establish the purification protocol of GFP-fused vinexin αΔac (N-terminal deletion mutant) in mammalian cells.

First, we solubilized HEK293 cells transiently expressing GFP-vinexin αΔac under various conditions and checked monodispersity. As a result, the condition with 1M salt concentration and 1% CHAPS as detergent showed the highest solubility and monodispersity. Next, we tried to purify GST-fused GFP-vinexin αΔac transiently expressed in FreeStyle 293 cells using batch method. As a result, 12 μg of GFP-vinexin αΔac was purified with 70% purity from 100 mL culture.

vinexin, purification, focal adhesion

講演番号：2H07-14
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 13:30～ ミーティングルーム H

ZNT5ZNT7 二重欠損株における亜鉛要求性酵素の運命は膜結合様式によって大きく左右される

Difference between “GPI anchor” and” transmembrane-polypeptide anchor” determines the fate of zinc enzymes in *ZNT5ZNT7* DKO cells

○下間 敬子、神戸 大朋（京都大生命）
○Keiko SHIMOTSUMA, TAIHO KAMBE (Kyoto Univ.)

膜結合型亜鉛要求性酵素の一つである組織非特異的アルカリホスファターゼ(TNAP)は、小胞体とゴルジ体に局在する亜鉛輸送体 ZNT5-ZNT6 ヘテロ二量体と ZNT7 ホモ二量体によって亜鉛を供給されることで活性化する。そのため両輸送体を欠損させた株において TNAP はタンパク質が分解され、酵素活性も持たない。一方で、同じく膜結合型亜鉛要求性酵素である ENPP1 は同じ欠損株において、分解されずに酵素活性を保持している。これらは同じ膜結合型亜鉛要求性酵素であるにも関わらず、全く異なる応答を示す。本研究では両者の相違点として膜結合様式に着目し、GPI アンカー型と一回膜貫通型の違いが分解及び酵素活性の差異を生むとの仮説を立てた。この仮説を検証するため、*ZNT5* と *ZNT7* を欠損させた株における、GPI アンカー型及び一回膜貫通型の分解と酵素活性を解析した。まず、CRISPR/Cas9 system を用いて *ZNT5* と *ZNT7* を同時に欠損させたヒト肺胞上皮腺癌細胞 A549(以下、*ZNT5ZNT7* 二重欠損株)を樹立した。この株に GPI アンカー型酵素として TNAP, CD73, PLAP, ENPP7 を、一回膜貫通型酵素として ENPP1, ACE, ACE2, CAIX を一過的に過剰発現させ、タンパク質発現をウエスタンブロット法と免疫染色により解析し、酵素活性についても測定を行った。GPI アンカー型酵素については TNAP の結果と同様、*ZNT5ZNT7* 二重欠損株においてタンパク質の分解と活性の低下が見られた一方で、一回膜貫通型酵素については ENPP1 の結果と同様に、*ZNT5ZNT7* 二重欠損株においても分解されず、酵素活性も保持されていた。これは仮説を支持する結果となった。現在それぞれの膜貫通部位を交換したキメラタンパク質を作成し、そのタンパク質発現や酵素活性を解析している。

Expression of TNAP, which is zinc enzyme located to the cell surface, is significantly decreased and failed to be activated in the cells lacking ZNT5 and ZNT7. On the other hand, ENPP1, another cell surface zinc enzyme, is not. In this study, we hypothesized that the differences in protein stability and enzyme activation between TNAP and ENPP1 was caused by their manner for anchoring to cell surface, specifically “GPI anchor” or “transmembrane-polypeptide anchor”. We disrupted *ZNT5* and *ZNT7* in A549 cells (*Z5Z7* DKO cells) with CRISPR/Cas9, and transfected expression plasmids harboring each cDNA of GPI anchor enzymes or transmembrane-polypeptide anchor enzymes into them. We showed that stability and activity of GPI anchor enzymes were markedly decreased in *Z5Z7* DKO cells compared with those in WT cells. In contrast, those of transmembrane-polypeptide anchor enzymes were comparable with WT cells. These supports our hypothesis.

zinc enzyme, zinc transporter, GPI anchor

発表責任者：下間敬子（keiko.shimotsuma.38x@st.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：2H07-15
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 13:30～ ミーティングルーム H

ミスフォールドタンパク質およびジスルフィド結合依存的な IRE1 の会合状態制御

Oligomeric regulation of IRE1 depending on misfolded proteins and disulfide bonds

○松崎 元紀[1,2]、稲葉 謙次[2]、奥村 正樹[1] ([1] 東北大学学際研、[2] 東北大多元研)
○Motonori MATSUSAKI[1,2], Kenji Inaba[2], Masaki Okumura[1] ([1]Tohoku Univ. FRIS, [2]Tohoku Univ. IMRAM)

哺乳動物の小胞体は、インスリンや IgG のような重要な分泌タンパク質を生産する場であり、それらの高い需要をまかなうため、洗練されたタンパク質立体構造形成機構を備えている。特にジスルフィド結合形成を伴う立体構造形成、すなわち酸化的フォールディングはよく研究されているが、この反応は複雑なため、天然型の立体構造を獲得できず、ミスフォールドしてしまうことがある。ミスフォールドタンパク質の蓄積(小胞体ストレス)は、アルツハイマー病や 2 型糖尿病などの疾患の原因となるため、細胞は小胞体ストレスを除去する小胞体ストレス応答機構(UPR)を備えている。

IRE1 は小胞体ストレスを感知する主要なセンサーの一つで、培養細胞レベルの実験から、小胞体ストレスが生じると会合し UPR のシグナルを発信すると報告されているが、実際の会合状態やその分子機構は未解明の部分が多い。

本研究では、大腸菌発現系により作製したリコンビナント IRE1 を用い、会合状態をモニターする系を開発した。従来の研究では IRE1 二量体が着目されていたが、実際にはミスフォールドタンパク質や分子間ジスルフィド結合依存的により大きな会合体を形成することが明らかとなった。

The mammalian endoplasmic reticulum (ER) is the compartment for production of important secretory proteins such as insulin and IgG, and is equipped with sophisticated protein folding machinery to meet their high demands. In particular, folding with disulfide bond formation, or oxidative folding, has been well studied, and in this complex oxidative folding pathway, newly-synthesized proteins sometimes fails to acquire native structure (misfolding). Because the accumulation of misfolded proteins (ER stress) causes a variety of diseases such as Alzheimer's disease and type 2 diabetes, cells are equipped with ER stress response mechanism (UPR) that relieves ER stress.

IRE1 is one of the main sensors of ER stress and has been reported that IRE1 oligomerizes under the ER stress in cultured cells, and makes UPR signals. However, the oligomeric state and its molecular mechanism are still unknown.

In this study, we developed a system to monitor oligomeric state of IRE1 using the recombinant IRE1. The new system revealed that IRE1 exactly oligomerized depending on misfolded proteins and intermolecular disulfide bonds.

unfolded protein response, IRE1, disulfide bond

講演番号：2H07-16
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 13:30～ ミーティングルーム H

サリドマイド催奇性を担う CRL4^{CRBN} のネオ基質の同定

Identification of CRL4^{CRBN} neosubstrates involved in thalidomide teratogenicity

○朝妻 知子[1]、伊藤 拓水[1]、山口 雄輝[2]、半田 宏[1]([1]東医大医、[2]東工大生命)
○ Tomoko ASATSUMA-OKUMURA[1], Takumi ITO[1], Yuki YAMAGUCHI[2], Hiroshi HANDA[1] ([1]Tokyo Med. Univ., [2]Tokyo Tech.)

サリドマイド(Thalidomide)は 1950 年代に鎮静剤として発売され、世界中で使用されたが、四肢形成や耳の異常といった深刻な催奇形性を有したため 1960 年代前半には市場から一度撤退された。他方で多発性骨髄腫などに対する優れた治療効果が判明したことから、近年になり厳格な統制の下、再認可されている。サリドマイドやその誘導体の標的因子は長年に渡り不明だったが、我々は 2010 年、サリドマイドの中核標的因子としてセレブロン(Cereblon, CRBN)を同定し、ゼブラフィッシュ胚などを用いて CRBN がサリドマイドによる催奇形性を司ることを明らかにした。この際に CRBN は CUL4-DDB1 と複合体を構成し、E3 ユビキチンリガーゼ複合体 CRL4^{CRBN} の基質受容体として機能することも示した。その後、サリドマイドやその誘導体依存的な CRL4^{CRBN} の様々な基質(Ikaros など)が複数の研究グループによって同定され、CRL4^{CRBN} は結合した化合物に依存して新たな基質（ネオ基質）を分解することが明らかとなってきた。これらネオ基質は抗多発性骨髄腫作用などサリドマイドおよび誘導体の主作用に関わることが示された一方で、副作用である催奇形成に関わる基質は未解明であった。

今回我々は、CRL4^{CRBN} のサリドマイド依存的な新規ネオ基質として TP63 (p63)遺伝子産物 ΔNp63α および TAp63α を同定した。p63 タンパク質は p53 ファミリーに属し、複数の発生過程にて重要な役割を有する。ΔNp63α は四肢発生に必須であり、変異が生じるとヒトでは四肢の形態異常を生じる。また TAp63α は蝸牛菅の発生や聴覚に重要な転写因子 Atoh1 の発現を制御する。本研究ではモデル動物としてゼブラフィッシュを用い、サリドマイド処理により CRBN が ΔNp63α と TAp63α のそれぞれを分解することで、胸ビレと耳胞の発生異常を引き起こすことを示した。本研究はネオ基質の実態を含めたサリドマイド催奇形性の分子基盤を生化学および発生学の２つのアプローチにより明らかにしており、その成果は催奇形性を軽減させた新たな薬剤開発に貢献できるものと期待している。

Thalidomide, now recognized as an effective anti-myeloma drug, is known for its serious teratogenicity. A direct target protein of thalidomide, CRBN is a substrate receptor of a CRL4 E3 ligase whose substrate specificity is altered by thalidomide and its analogs. Here we show p63 isoforms as thalidomide-dependent neosubstrates involved in its teratogenic activities. ΔNp63α and TAp63α are important for limb and cochlea development respectively. We demonstrate that thalidomide exerts its teratogenic effects by inducing the breakdown of ΔNp63α and TAp63α by using zebrafish model. Our results may contribute to development of new thalidomide analogs without teratogenic activity.

ubiquitin, thalidomide, PROTACs

講演番号：2H07-17
質疑応答日時、会場：3 月 19 日 13:30～ ミーティングルーム H

熱帯熱マラリア原虫が産生する Histidine-rich protein 2 の病原性メカニズムの解明

Pathogenic mechanism of Histidine-rich protein 2 produced by *Plasmodium falciparum*

○岩崎 崇[1,2]、金山 葉瑠[1]、下田 麻由[2]、河野 強[1,2]（[1]鳥取大・農、[2]鳥取大院・持続）
○Takashi IWASAKI[1,2], Haru KANAYAMA[1], Mayu SHIMODA[2], Tsuyoshi KAWANO[1,2] ([1]Tottori Univ., [2]Grad. Sch. Tottori Univ.)

熱帯熱マラリアは、熱帯熱マラリア原虫 (*Plasmodium falciparum*) がヒト赤血球に感染することで致命的な重症化を引き起こす深刻な感染症である。一方で、マラリア Histidine-rich protein 2 (HRP2) は、熱帯熱マラリア原虫がヒト赤血球に感染した際に、ヒト血中に多量に分泌されるタンパク質である。これまでマラリア HRP2 は感染診断の際の血中マーカーとして研究されてきたが、本研究ではマラリア HRP2 が様々なヒト細胞に取り込まれ、細胞内で基底レベルのオートファジーを阻害することで細胞毒性を示すことを明らかにした。特に、マラリア HRP2 は、熱帯熱マラリア原虫が感染したヒト体内と同じ濃度（90-100 nM）においても毒性を示したことから、自然界において病原性因子として機能していることが示唆された。また、血清タンパク質濃度が低い場合は、マラリア HRP2 の細胞膜透過と細胞毒性が増加することを明らかにした。この結果は、栄養失調状態のような血清タンパク質濃度が低い状態では、マラリア HRP2 の危険性が高まることを示唆しており、実際に栄養失調状態ではマラリア感染による致死率が高まるという事実と一致する。さらに本研究では、マラリア HRP2 の細胞毒性には Ca^{2+} イオンが必須であることと、金属イオンキレート剤 : エチレンジアミン四酢酸（EDTA）がマラリア HRP2 の細胞毒性を抑制することを発見した。EDTA はすでに金属関連疾患に対する医薬品として承認されていることから、マラリア HRP2 に対する有力な治療薬として期待される。

本研究では、これまで単なる血中マーカーとして考えられてきたマラリア HRP2 が、熱帯熱マラリアの重症化に関与する新たな病原性因子である可能性を明らかにした。さらに本研究は、マラリア HRP2 の細胞毒性メカニズムとその抑制方法を明らかにしたことで、熱帯熱マラリアの重症化を防ぐ治療法の開発に大きく貢献すると考えられる。

Plasmodium falciparum causes serious malaria symptoms. *P. falciparum* produces and secretes histidine-rich protein 2 (PfHRP2) in large amounts into human blood when *P. falciparum* infects human erythrocytes. Thus, PfHRP2 is well known as a diagnostic marker for malaria infection. However, here we identified PfHRP2 as a new pathogenic factor produced by *P. falciparum*. PfHRP2 showed cell-penetration and cytotoxicity against various human cells. The cytotoxicity of PfHRP2 required Ca^{2+} ion and was suppressed by ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA). Our findings suggest that PfHRP2 plays as a pathogenic factor in *P. falciparum*-infected patients and EDTA is a promising candidate of the therapeutic reagent to suppress the PfHRP2 pathogenicity.

malaria, histidine, cell-penetration

発表責任者：岩崎 崇（itaka@tottori-u.ac.jp）

講演番号：3A01-01
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:00～ ミーティングルーム A

硫黄代謝を司る転写制御因子 CysB がプラスミド非感受性の鍵因子である

CysB, a master regulator of sulfur metabolism, is involved in “plasmid-insensitivity” of environmental bacterium

○河野 響[1]、水口 千穂[1,2]、岡田 憲典[1]、野尻 秀昭[1,2]（[1]東大・生物工学セ、[2]東大・微生物連携機構）
○Hibiki KAWANO[1], Chiho Suzuki-Minakuchi[1,2], Kazunori Okada[1], Hideaki Nojiri[1,2] ([1]BRC, UTokyo, [2]CRIIM, UTokyo)

プラスミドの保持は宿主細菌の fitness の低下を招くという通説に対し、当グループは *Pseudomonas resinovorans* CA10dm4 株がその低下を回避可能な「プラスミド非感受性」であることを見出した。昨年度までに、硫黄代謝系の主要転写制御因子 CysB に支配される転写制御ネットワークがプラスミド非感受性に関与することを同定した。当該ネットワークは CysB レギュロンである三つの転写制御因子 (*spiR1, spiR2, spiR3*) を含み、特に *spiR3* のプラスミド非感受性への直接的な関与を実証したが、*spiR3* の上流／下流の機構は未解明であったため、今年度はその機構の解明を目指した。

過去に提唱された CysB の結合領域が *spiR1* と *spiR2* のプロモーターの上流には見出されたため、これらは CysB の直接的な制御が示唆された。一方で *spiR3* の場合、CysB 結合領域は見出されず、間接的な制御が示唆された。ここで、他グループのホモログ（*P. aeruginosa* PAO1 株上の *sfnR1, sfnR2*）の研究を踏まえると、*spiR3* の転写が SpiR1, SpiR2 に加え SpiR3 自身にも制御される可能性が考えられた。そこでレポーターアッセイにより同定した *spiR3* のプロモーター領域と各精製タンパク質との結合能をゲルシフトアッセイで評価した。その結果、いずれの場合も結合能が確認されたため、CysB 直接の制御下に *spiR1, spiR2* が、さらにその下流で *spiR3* が SpiR1, SpiR2 および自身に制御される階層構造（図）が明らかになった。また *spiR3* 破壊株を用いた RNA-Seq 解析から、その下流に複数の転写制御因子や TCA サイクル関連の遺伝子を同定した。

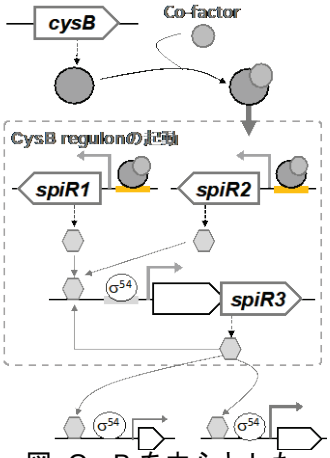


図. CysB を中心とした転写制御ネットワーク

Although plasmid fitness cost occurs in almost all combinations of plasmid and its host, no plasmids impose a cost on *Pseudomonas resinovorans* CA10dm4. We named this novel trait as “plasmid-insensitivity” and clarified that CysB-regulated transcriptional network containing three transcriptional regulators *spiR1, spiR2 and spiR3* was involved in the trait. Though CysB-binding site was found in the upstream regions of both *spiR1* and *spiR2* promoter regions, the site was missing in that of *spiR3*. Actually, it was shown that all of SfnR1, SfnR2 and SfnR3 could bind to the *spiR3* promoter region by electrophoretic mobility shift assays. As shown in figure, we clarified a hierarchical structure in which *spiR1* and *spiR2* are under direct regulation of CysB, and furthermore *spiR3* is regulated by SpiR1, SpiR2 and itself. In addition, *spiR3*-regulated genes were successfully identified by RNA-Seq using *spiR3* gene deletion mutant.

Pseudomonas, transcriptional regulation, sulfur metabolism

発表責任者：野尻秀昭（anojiri@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3A01-02
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:00～ ミーティングルーム A

新規抗真菌薬感受性検査の開発

Development of novel antifungal susceptibility tests

○中田 惇彦、田邊 公一（龍谷大農）
○Atsuhiko NAKATA, Kouiti TANABE (Ryukoku Univ.)

カンジダ属菌は皮膚や消化管に常在する真菌であるが免疫不全患者には侵襲性の感染症を引き起こす事がある。侵襲性カンジダ症は院内感染症の上位に位置する感染症であり臨床上の大きな問題となっている。侵襲性カンジダ症の治療は、発症後 24 時間以内に開始されれば予後は良好であるとされているが、適切な抗真菌薬を決定するための薬剤感受性試験には数日を要する。そのため、カンジダ属の薬剤感受性を簡便かつ迅速に評価する検査方法が求められている。

DNA 結合試薬である propidium monoazide(PMA)は死菌にのみ取り込まれ染色体 DNA と結合し、死菌特異的に PCR を阻害出来る。抗真菌薬で短時間処理したカンジダ属菌を PMA 処理し、菌液を直接 qPCR に供する。抗真菌薬に感性の株は死菌の割合が高く、耐性株は死菌の割合が低く判定されると考えられ、薬剤耐性株の迅速検出が可能になると考えた。

非病原性の実験室酵母 S288C と代表的な抗真菌薬であるカスポファンギン(CPFG)を用い、PMA-qPCR を用いた薬剤感受性試験の最適な実験条件、すなわち①菌数、②培養方法、③PMA 処理時間、④CPFG 濃度について検討した結果を紹介する。

Candida sp. is a commensal fungi that normally reside in skin and digestive tract but sometimes causes invasive infections in immunocompromised patients. Candidiasis is a serious issue in clinical situations because it is one of the most common nosocomial infections. The treatment of candidiasis within 24 hours was associated with better prognosis. However, the drug susceptibility test to decide appropriate antifungal agents requires several days to perform. Simple and prompt drug susceptibility test is required. Propidium monoazide (PMA) permeates into only dead cells, bind to chromosomal DNA, and inhibit PCR. We planned to apply PMA-qPCR methods to quick antifungal susceptibility test for *Candida* sp. The *Candida* cells exposed to antifungal drugs were directly used for PMA-qPCR. Live- and dead-cells are expected to result in high and low efficiency in PMA-qPCR, respectively. This live-dead discrimination will support the estimation of the drug susceptibility of *Candida* strains.

Experimental conditions of the PMA-qPCR using laboratory yeast S288C and caspofungin (CPFG) include cell number, growth condition, PMA-treatment time, and the concentration of CPFG, were examined.

antifungal susceptibility test, PMA-qPCR, Candida

発表責任者：中田　惇彦（naka-atsu-5211@ezweb.ne.jp）

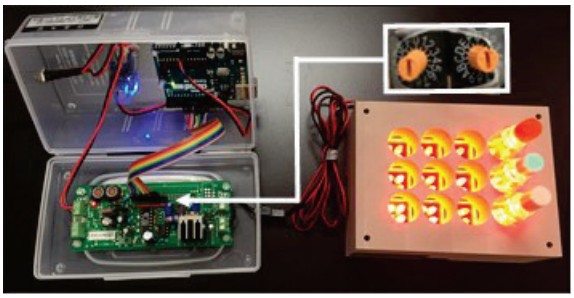
講演番号：3A01-03
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:00～ ミーティングルーム A

特定波長下における微細藻類の小スケール培養での照射光の影響に関する研究

Study on the effect of light using a specific wavelength in the small-scale growth of the microalgae

○阿部 里奈、伊藤 賢一、大内 秋比古、青山 忠（日本大学）
○Rina ABE, Ken-ichi ITOH, Akihiko OUCHI, Tadashi AOYAMA (Nihon Univ.)

微細藻類はその増殖速度が速く，他の食糧生産と競合しないこと等から有用な生物資源としての利用が検討されている。このうち特に，グリコーゲンをその体内に貯蔵するシアノバクテリアやデンプンを貯蔵するクロレラ等が燃料資源としての可能性が期待され、様々な条件での増殖実験が現在までに盛んに研究されている。しかしながらその増殖研究においては現状，実験室レベルではリットル単位の容器内へ光源として LED 等を用いた装置や,屋外の場合は太陽光によるプラントレベル(トン単位))のものが多く，藻類の増殖における照射光の影響に関してそのサンプルごとの誤差を小さくした系での検討が必要なのではないか，と我々は考えた。そこで近年我々は藻類増殖における光強度やその波長がどのような影響を及ぼしているかを詳細に検討するため,小型のフォトバイオリアクタを開発した。今回,我々は本装置を用いてシアノバクテリア，*Synechocystis* sp. PCC 6803，における 629 nm 照射下で光強度を様々に変化させた増殖実験を行い，5.14 W m^{-2} (26.88 μmol m^{-2} s^{-1}) という最適強度条件の特定に成功した。本講演では本結果につながる，光学濃度 (OD 値) や乾燥重量ベースの詳細を紹介する。



Since microalgae have their fast growyh rate and is not completed with the other food production, the use of microalgae have been studied as the bioresource. Among them, cyanobacteria, who have been accumulated the glycogen, and chlorella, who have been heaped the starch, were investigated in the abilities of the fuel sources. However, in the present research of the growth, because the vessel of the apparatuses in the laboratory and the plants were very large scale, the influence of the optical intensity is not clear. Recently, we have been developed the devices, compact photobioreactor (c-PBR), for the purpose of the effectiveness in the algae growth. Herein, we report that the optimum light intensity conditions under red LED illumination (629 nm) are made clear in the growth of cyanobacteria, synechocystis sp. PCC 6803.

Microalgae, Growth, Photobioreactor

発表責任者：阿部里奈（csri19003@g.nihon-u.ac.jp）

講演番号：3A01-04
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:00～ ミーティングルーム A

沖縄で分離した藍還元菌の生育特性

Growth characteristics of indigo-reducing bacteria isolated in Okinawa

○世嘉良 宏斗、松田 和希、松本 亜里奈、荻 貴之（沖縄県工業技術センター）
○ Hiroto YOKARYO, Kazuki MATSUDA, Arina MATSUMOTO, Takayuki OGI (Okinawa Industrial Technology Center)

沖縄の伝統的な藍染めでは微生物を用いた発酵建てと呼ばれる技法で植物由来の藍による染色が行われる。発酵建てでは、非水溶性の藍色素（インディゴ）を還元して水溶性の成分へ変換するために好アルカリ性の微生物（藍還元菌）が利用されている。しかし藍染めを行う現場では経験的な勘を頼りに発酵建てが行われているため、藍還元菌を良好に生育できず、安定的に染色を行えないことが課題となっている。そこで本研究では発酵建てを安定的に行うための基礎的な知見を得るため、藍還元菌として知られる *Alkalibacterium* 属細菌の生育特性を調べた。

沖縄県内の藍染め工房や藍染料である泥藍（沈殿藍）の製造所で採取した試料から分離した 40 菌株の *Alkalibacterium* 属細菌について生育条件を調べたところ、初発 pH 9.0－10.5 の範囲で良好に生育したが、pH 11.5 以上では全ての菌株が生育しなかった。また、培地中の塩化ナトリウムの生育可能な濃度範囲は 0－10%で、ほとんどの菌株は 2%のとき最も生育が良かった（1 菌株のみ 5%）。

さらに、その他の無機成分（鉄、マグネシウム、カリウム）による生育への影響を調べたところ、分離菌株の生育は酸化鉄（Ⅲ）存在下で最も促進されることが分かった。このことから、インディゴを還元する *Alkalibacterium* 属細菌が鉄を電子供与体として利用している可能性について考察した。

In Okinawa (Japan), natural indigo dyeing is done by a traditional technique called “Hakko-date”. Hakko-date utilizes alkaliphilic bacteria (indigo-reducing bacteria) to reduce the insoluble pigment (indigo) and convert it to water-soluble form. However, because indigo dyers rely on empirical intuition for fermentation, they are often unable to grow indigo-reducing bacteria in a sufficient conditions, which is a problem for stable dyeing of indigo.

In this study, the growth characteristics of *Alkalibacterium* spp. known as indigo-reducing bacteria were investigated in order to obtain basic properties for stable fermentation.

We examined the growth conditions of *Alkalibacterium* spp. (40 strains) isolated from indigo dyeing factories in Okinawa. These isolates grew well in the initial pH range of 9.0－10.5, but not grew above pH 11.5. The isolates were able to grow in the medium containing 0－10% sodium chloride, and most of the strains grew optimum at 2%. The effects of other minerals (iron, magnesium, and potassium) on growth were also investigated, and growth of the isolates was found to be most enhanced in presence of iron oxide (III). We discuss the possibility that the indigo-reducing *Alkalibacterium* spp. may utilize iron as an electron donor.

Alkalibacterium, Indigo, Iron

発表責任者：世嘉良 宏斗（yokryouh@pref.okinawa.lg.jp）

講演番号：3A01-05
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:00～ ミーティングルーム A

オボムチン由来 *O*-結合型糖鎖の腸内細菌による分解

O-Glycans from ovomucin are degraded by intestinal bacteria

○高田 紘翠、加藤 紀彦、片山 高嶺（京都大学）
○Hiromi Takada, Toshihiko Katoh, Takane Katayama (Kyoto Univ.)

腸内細菌は、宿主が摂取した食物の未消化成分や宿主自身が産生する分泌物などを栄養源として増殖する。特に腸管内に分泌されるムチン糖タンパク質に結合した*O*-結合型糖鎖は一部の腸内細菌（ムチン資化性菌）の栄養源となる。*O*-結合型糖鎖は消化管ムチンのみならず一部の食品にも由来するが、その菌叢形成への影響は未解明な点が多く残されている。本研究は、ムチン糖タンパク質糖鎖が腸内細菌の生育に与える影響を解明することを目的とし、ムチン資化性菌*Akkermansia muciniphila*および*Bifidobacterium bifidum*を、ブタ胃由来ムチン（PGM）もしくは卵白ムチンを糖源として培養し、資化性および分解能を調べた。PGMを糖源とした場合は両菌とも増殖したが、卵白ムチンの場合は*A. muciniphila*のみ増殖が認められた。一方、増殖の有無に関わらず両菌ともに*O*-結合型糖鎖を分解し、上清中に単糖を遊離させていた。これら遊離単糖は、酪酸産生菌などにクロスフィードされると考えられる。以上のことから、*A. muciniphila*および*B. bifidum*等のムチン資化性菌は宿主由来のみならず食品由来のムチン糖タンパク質糖鎖にも作用すること、分解過程で遊離した単糖が腸内細菌叢の形成や構成変化を通して宿主に影響を与える可能性があることが強く示唆された。

Gut microbes can degrade indigestible oligosaccharides and complex sugar chains, and it is well known that the *O*-glycans of mucin glycoproteins secreted from host intestinal cells serve as an energy source for those bacteria. *O*-Glycans present in intestines are derived not only from gut epithelia but also from diet. However, how and by what extent dietary *O*-glycans are degraded by microbes and thereby affect gut microbial community are poorly understood. In this study, using porcine gastric mucin (PGM) and ovomucin from hen egg white, we analyzed *O*-glycan degradation by representative mucin-degrading microbes, *Akkermansia muciniphila* and *Bifidobacterium bifidum*. Both bacteria grew well on PGM; however, growth on ovomucin was observed for *A. muciniphila* only. Nonetheless, MALDI-TOF/MS analysis revealed that both *A. muciniphila* and *B. bifidum* similarly degrade *O*-glycans of PGM and ovomucin. Quantification of the sugars in the spent media showed that some of the monosaccharides liberated from the two mucins are left unconsumed. These results suggest that dietary mucins can affect microbiota composition through cross-feeding and that the effects depend on the sugar composition of the *O*-glycans and the bacteria involved in its degradation.

gut microbe, mucin, *O*-glycan

講演番号：3A01-06
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:00～ ミーティングルーム A

Aspergillus nidulans における一酸化窒素ストレス誘導型グリセロアルデヒド 3-リン酸デヒドロゲナーゼ GpdC の機能解析
characterization of nitrosative stress induced glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase GpdC in *Aspergillus nidulans*.
○門岡 千尋、鈴木 康太、桝尾 俊介、高谷 直樹（筑波大生命環境）
○Chihiro KADOOKA, Kouta SUZUKI, Syunsuke MASUO, Naoki TAKAYA (Univ. of Tsukuba.)

一酸化窒素（NO）は高反応性のラジカルであり、強い細胞毒性を示す。糸状菌は NO ストレスに対して高い耐性を示すが、その耐性機構の全貌は解明されていない。本研究では、NO ストレスにより発現が誘導される推定グリセルアルデヒド 3-リン酸デヒドロゲナーゼ（GAPDH）をコードする *gpdC* 遺伝子の NO ストレス耐性機構における役割を解析した。

まず、*A. nidulans* がもつ 2 つの GAPDH アイソザイムである GpdA と GpdC を精製し、各酵素の NOC-5（NO ドナー）耐性を比較した結果、GpdA の NOC-5 に対する IC50 は 27.9 μM であるのに対し、GpdC は 98.6 μM であったことから、GpdC は NO 耐性をもつことが示唆された。次に *gpdC* 破壊株を構築し、NO ストレス耐性を解析した結果、*gpdC* 破壊株は NO 存在下において生育が遅延した。一方、酢酸やグルタミン酸などの非発酵性炭素源を炭素源とした場合、野生株においても NO 存在下で顕著に生育が遅延したため、NO ストレス条件下ではミトコンドリアの機能が低下する可能性が示唆された。さらに、エタノール生産量を比較した結果，NO ストレス条件下において *gpdC* 破壊株のエタノール生産量は野生株の 20%に低下した。以上の結果より、GpdC は解糖系とエタノール発酵の促進を介して *A. nidulans* の NO ストレス耐性に関与することが示唆された。

Nitric oxide (NO) is one of the highly reactive radicals. Filamentous fungus show highly tolerant to NO stress, but the NO resistance mechanism has not been elucidated. In this study, we analyzed the physiological role of the *gpdC* gene, which encodes a putative glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) in NO stress tolerance. First, we purified GpdA and GpdC, and compared the NOC-5 (NO donor) resistance of each enzyme. The IC50 of GpdA was 27.9 μM, whereas the IC50 of GpdC was 98.6 μM, indicating that GpdC to be NO resistance GAPDH. Next, we constructed *gpdC* disruptant and analyzed their tolerance to NO stress. The growth of *gpdC* disruptant was delayed in the presence of NO. On the other hand, when non-fermentable carbon sources such as acetate and glutamate were used as carbon sources, the growth of wild type strain was also significantly delayed in the presence of NO, it was suggested that NO triggered mitochondrial dysfunctions. These results indicated that GpdC contributes to NO stress tolerance through the enhancing of glycolysis and ethanol fermentation in *A. nidulans*.

Aspergillus nidulans, nitric oxide, GAPDH

発表責任者：高谷直樹（takaya.naoki.ge@u.tsukuba.ac.jp）

講演番号：3A01-07
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:00～ ミーティングルーム A

植物由来精油成分ファルネソールに対する糸状菌 *Aspergillus fumigatus* の応答機構
Cellular response to plant-derived farnesol in *Aspergillus fumigatus*
○老木 紗予子[1]、二宮 章洋[1]、浦山 俊一[1,2]、萩原 大祐[1,2]（[1]筑波大・生命環境、[2]筑波大・MiCS）
○Sayoko OIKI[1], Akihiro NINOMIYA[1], Syun-ichi URAYAMA[1,2], Daisuke HAGIWARA[1,2] ([1]Fac. of Life and Env. Sci., Univ. of Tsukuba, [2]MiCS, Univ. of Tsukuba）

【背景と目的】精油は植物から抽出された親油性化合物の混合物であり、様々な微生物に対して抗菌作用がある。バラやレモングラスの主要な精油成分であるファルネソールは、ヒト病原性モデル糸状菌 *Aspergillus fumigatus* に抗菌活性を示し、細胞壁の維持を阻害することが報告されている。しかし、ファルネソールに対する糸状菌の詳細な応答分子機構は不明なままであり、細胞内の動態についてもまったく分かっていない。本研究では、*A. fumigatus* において、アゾール系薬剤への耐性に関与することで知られる薬剤排出系 ABC トランスポーターCdr1B に着目し、ファルネソールへの応答分子機構を明らかにすることを目的とした。
【方法と結果】ファルネソールを添加した *A. fumigatus* 菌糸の RNA-seq 解析を行った結果、*cdr1B* の発現が顕著に上昇した。そこで、ファルネソール存在下で *cdr1B* 破壊株の生育を評価したところ、*cdr1B* 破壊株はファルネソールに対して野生株よりも高い感受性を示した。また、ファルネソールを添加した *cdr1B* 破壊株の細胞内ファルネソール蓄積量を GCMS により定量した結果、*cdr1B* 破壊株では野生株よりも高いファルネソール量が検出された。以上より、*A. fumigatus* においてファルネソールは ABC トランスポーターCdr1B によって排出されることが示唆された。他の精油成分（チモールとシトラール）を用いた RNA-seq 解析においても *cdr1B* の発現上昇が認められたため、Cdr1B が多様な精油成分の排出に機能する可能性が考えられる。

Essential oil is a mixture of lipophilic compounds extracted from plants. Farnesol, the major component of essential oil from rose and lemongrass, shows antifungal activity against pathogenic filamentous fungus, *Aspergillus fumigatus*. However, the molecular mechanism of the antifungal action remains to be elucidated. Here, we focus on Cdr1B, an ABC transporter that is involved in azole resistance, and aim to clarify the cellular response mechanism of farnesol in *A. fumigatus*.

RNA-seq analysis of farnesol-treated *A. fumigatus* cells showed that the expression of *cdr1B* was upregulated by farnesol. The deletion of *cdr1B* resulted in higher sensitivity to farnesol compared with wild-type cells. By quantification of intracellular farnesol in GCMS analysis, *cdr1B* mutant cells were found to accumulate more farnesol than wild-type cells. In conclusion, Cdr1B was suggested to be involved in export of farnesol in *A. fumigatus*.

Aspergillus, Farnesol, ABC transporter

発表責任者：萩原大祐（hagiwara.daisuke.gb@u.tsukuba.ac.jp）

講演番号：3A01-08
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:00～ ミーティングルーム A

Novel function of transglutaminases in wound protection at the site of cell-to-cell communication in fungal multicellularity

○Md. Abdulla Al MAMUN[1], Kiyotaka HITOMI[2], Jun-ichi MARUYAMA[1,3] ([1]Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo, [2]Grad. Sch. Pharm. Sci., Nagoya Univ, [3]CRIIM, UTokyo)

[Background]

Transglutaminase is a cross-linking enzyme mediating the formation of isopeptide bond between the γ-carboxamide group of glutamine and the ε-amino group of lysine. In animals, transglutaminase plays an important role in blood clotting upon injury. However, the physiological function of microbial transglutaminases is not largely known. In filamentous fungi, hyphae are typically compartmented into cells by the presence of a septum, and its perforated structure, the septal pore, allows a communication between flanking cells and concomitantly involves the risk of catastrophic cellular damage upon hyphal wounding. Our previous large-scale localization screening in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*[1)] identified a protein containing transglutaminase domain as one of the septum-localizing proteins. Here, we characterized a new function of fungal transglutaminases in the wound protective response for plugging the septal pore, a subcellular site of cell-to-cell communication.

[Results]

A. oryzae possesses 3 genes for the proteins containing transglutaminase domain. When expressed as EGFP fusion, two of the proteins were found to accumulate at the septal pore upon hyphal wounding. Gene deletion resulted in a reduced ability to plug the septal pore upon hyphal wounding. Since the positions of residues Cys, His and Asp are conserved as the catalytic triad of transglutaminase, amino acid substitutions with alanine caused a defect in the septal pore plugging upon wounding. Using a synthetic substrate 5-(biotinamido)pentylamine and streptavidin-conjugated fluorescent probe to microscopically detect the crosslinked products, transglutaminase activity was detected at the septal pore upon hyphal wounding. These results suggest a wound protection via the cross-linking activity of transglutaminases. Collectively, this study provides a novel insight into fungal transglutaminase function in the protective regulation at the site of cell-to-cell communication in fungal multicellularity.

l) Mamun *et al.*, Annual meeting of JSBBA (2020) 3A12p15

transglutaminase, septal pore, wounding

発表責任者：Jun-ichi MARUYAMA（amarujun@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3A01-09
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:00～ ミーティングルーム A

アカパンカビの *col-26* 株と *sor-4* 株のソルボース耐性とグルコース抑制に関する研究
Sorbose resistance and glucose repression of *col-26* and *sor-4* mutants in *Neurospora crassa*.
○平井 献士[1]、井手本 拓也[2]、加藤 志穂[2]、一石 昭彦[1,2]、藤村 真[1,2] ([1]東洋大院・生命、[2]東洋大・生命)
○Kenshi HIRAI[1], Takuya IDEMOTO[2], Shiho KATO[2], Akihiko ICHIISHI[1,2], Makoto FUJIMURA[1,2] ([1]Toyo University Graduate Schools, [2]Toyo University)

アカパンカビは、希少糖ソルボースを含む培地では菌糸生育が阻害されコロニー状に生育する。我々は、グルコース抑制（CCR）因子のグルコース輸送体 *sor-4* 株と転写因子 *col-26* 株（コウジカビ *amyR* ホモログ）がソルボース耐性株であることを報告している。本研究では、ソルボース耐性機構を調べるために、①コウジカビのソルボース耐性機構との比較、②CCR 因子との二重変異株の作出と解析、③2-デオキシグルコース（2-DG）耐性 *dgr* 株のソルボース感受性と変異同定を行った。

コウジカビのソルボース耐性はガラクトース代謝と関連している。*col-26* 株と *sor-4* 株はガラクトース培地で野生株より生育が促進される傾向が見られたが、ガラクトチトールやソルビトール培地では顕著な差が認められず、コウジカビのソルボース耐性機構と異なることが示唆された。また、CCR の主要転写因子 CRE-1 を負に調節する PRK-10 キナーゼの変異株と交雑し、*col-26; prk-10* 株及び *sor-4; prk-10* 株を作製した。両株はソルボース耐性を示し、CRE-1 とは独立してソルボース耐性が起こると考えられた。これまで、2-DG 耐性株（*dgr-1*（染色体 VL）、*dgr-2*（IL）、*dgr-3*（IL）、*dgr-4*（IR））が取得されているが、*dgr-3*（*sor-4*）以外の変異遺伝子は未同定である。*dgr-4* 株以外の *dgr* 株はソルボース耐性を示した。染色体マッピング情報から候補遺伝子を塩基配列解析したところ、*dgr-1* 株は *col-26 遺伝子*に、*dgr-4* 株はヘキソキナーゼ *hxk-2* 遺伝子に変異が存在した。*dgr-2* 株は新規のソルボース耐性遺伝子である可能性があり、現在、解析を進めている。

Sorbose inhibits hyphal growth in *Neurospora crassa*. Previously, we reported that two mutants of sugar transporter *sor-4* and transcription factor *col-26* in glucose-repression (CCR) pathway show sorbose resistance. Hyphal growth analysis on medium containing various carbon source and phenotypical analysis of double mutants in CCR pathway suggested that sorbose-resistance mechanism in *N. crassa* is different to that of *Aspergillus nidulans* and independent to a major transcription factor CRE-1 in CCR pathway. Most of CCR mutants including *sor-4* and *col-26* mutants are resistant to glucose analog, 2-deoxyglucose (2-DG). Among 2-DG resistant mutants (*dgr-1, 2, 3* and *4*), only *dgr-3* gene has been identified as *sor-4* gene. Therefore, we performed phenotypical analysis on sorbose medium and DNA-sequence analysis of putative mutation in *dgr* mutants. All *dgr* mutants, except *dgr-4*, showed sorbose resistance. The mutations of *dgr-1* and *dgr-4* strains were found in *col-26* and hexokinase *hxk-2* genes, respectively.

carbon catabolite repression, sorbose resistance, *Neurospora crassa*

講演番号：3A01-10
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:00～ ミーティングルーム A

GWAS を用いた *Zygosaccharomyces rouxii* の凍結耐性メカニズムの解明
Investigating the Freezing Resistance Mechanism of *Zygosaccharomyces rouxii* using GWAS
○森本 一輝、菊池 成真、邱 泰瑛、小西 正朗（北見工業大学）
○ Kazuki MORIMOTO, Narumi KIKUCHI, Tai-Ying CHIOU, Masaaki KONISHI (Kitami Institute of Technology)

Zygosaccharomyces rouxii は高い耐塩性と耐糖性など複数のストレス耐性を有しているが、凍結耐性についてはほとんど知られていない。発表者らは寒冷気候の北海道の環境から凍結耐性が高い *Z. rouxii* SRT88 株を分離している。本研究では、この株がどのように凍結耐性を獲得し、その機能を発揮しているかを調べるため、Genome Wide Association Study (GWAS)および比較メタボローム解析を行った。

凍結耐性が異なる *Z. rouxii* 12 株のドラフトゲノムをシークエンスし、基準株のゲノムデータにマッピングした後、凍結耐性と一塩基多型(SNPs)の関連性を GWAS により解析した。凍結耐性に関与した SNPs を 202 箇所検出した。SNPs に基づく系統樹を作成したところ、SRT88 は基準株から最も遺伝的距離が遠いことがわかった。特に、ヒートショックタンパク質(HSP110) やアスパラギン酸やグルタミン酸の生合成に関与する遺伝子に変異が蓄積していた。メタボローム解析によると SRT88 株などの凍結耐性が高い株はグルタミン酸やアスパラギン酸などが細胞内に蓄積していた。*Z. rouxii* は HSP110 やアミノ酸代謝の変異が凍結耐性付与に関与していることが示唆された。

Zygosaccharomyces rouxii shows extreme high osmotic tolerance and resists the other stresses. Interestingly, we have already isolated a rare freeze-tolerant strain in the species *Z. roxii* from environment in Hokkaido, a cold region of Japan. In this study, genome-wide association study and metabolome analysis during several *Z. rouxii* strains were conducted to reveal why SRT88 strain has the ability of high freeze tolerance. Draft genome sequencing for 12 strains of *Z. rouxii* was carried out, and the sequences were mapped to the genome data of type strain. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) associated to freeze tolerance were subsequently screened by GWAS. As the results, large taxonomic distances based on SNPs between SRT88 and the other strains were observed. 202 SNPs associated with freeze tolerance were detected, several of which related to heat shock protein 110 and biosynthesis of asparagine and glutamic acid. According to the metabolomics, SRT88 and the other freeze-tolerant strain tended to accumulate asparagine and glutamic acid in the cells after freezing treatments. These results revealed that HSP110 and the biosynthesis of certain amino acids were regarded as the keys of freeze-tolerant ability for *Z. rouxii*.

yeast, freeze-tolerant, genome wide association study

発表責任者：小西正朗（konishim@mail.kitami-it.ac.jp）

講演番号：3A01-11
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:00～ ミーティングルーム A

コリネ型細菌の脂肪酸代謝に見出した基質回路（Futile cycle）の検証と意義

Futile metabolic cycle identified in fatty acid metabolism of *Corynebacterium glutamicum*

○大竹 辰徳、高橋 敬祐、井元 瞭介、竹野 誠記、池田 正人（信州大農）
○Tatsunori OHTAKE, Keisuke TAKAHASHI, Ryosuke IMOTO, Seiki TAKENO, Masato IKEDA (Shinshu Univ.)

チオエステラーゼ（Tes）とアシル-CoA シンセターゼ（FadD）は、それぞれ、アシル-CoA の脱 CoA 化とその逆反応を担う。我々は、これまでの実験結果に基づき、コリネ菌の Tes と FadD には本菌特有の役割があると考えている。その役割とは、本菌がミコール酸層というユニークな外膜を有することと関係する。ミコール酸合成には遊離脂肪酸が必要で、*de novo* 合成されたアシル-CoA は一定量、常に Tes の作用で遊離脂肪酸に分解されなければならない。その際、余剰の遊離脂肪酸は FadD によりアシル-CoA に戻され、細胞膜合成にリサイクルされる。つまり、コリネ菌では Tes と FadD が常時発現していて、アシル-CoA と遊離脂肪酸の間で、基質回路を形成しているとの仮説である。脂肪酸の分解系を持たないコリネ菌にとっては、余剰脂肪酸をリサイクルする一種の生存戦略と考えると理に適う。しかし、生物界で Tes-FadD から成るそのような回路は知られていないため、その存在を立証するには両者が同時に発現していることを示す必要がある。今回、遺伝子発現および酵素活性の両面からその検証を試みた。その結果、野生株のグルコース培養細胞で、両者が共に発現していることが確認された [1)]。野生株で FadD を破壊すると脂肪酸が生成する現象や、その脂肪酸生成は Tes の同時破壊でキャンセルされ Tes の増強で増加する現象は、同回路の存在によって説明できる。この戦略を、脂肪酸高生産菌に適用すると、脂肪酸生産量は約 7 割向上し、力価は 1 g/L（対糖収率 10%）に達した [1)]。

1) Appl Environ Microbiol, *in press* (2021)

Acyl-CoA thioesterase and acyl-CoA synthetase catalyze opposing reactions between free fatty acids and their CoA derivatives. In this study, we demonstrated that these enzymes were co-expressed during growth to form a futile cycle, presumably as the recycling system of excess fatty acids in the microorganism naturally deficient in the fatty acid degradation pathway. We further demonstrated that engineering of the cycle in a fatty acid producer led to dramatically improved production.

Corynebacterium glutamicum, futile cycle, fatty acid production

発表責任者：池田正人（m_ikeda@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：3A01-12
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:00～ ミーティングルーム A

コリネ型細菌によるパルミトレイン酸の生産（第三報）

Engineering of *Corynebacterium glutamicum* for palmitoleic acid production (3rd)

○北村 嘉子、竹野 誠記、池田 正人（信州大農）
○Kako KITAMURA, Seiki TAKENO, Masato IKEDA (Shinshu Univ.)

C16:1Δ9 の長鎖不飽和脂肪酸であるパルミトレイン酸（Pol）は機能性脂質の一つとして有用であるが、その供給源は一部の植物に限られている。我々は、本来、Pol の生合成能を持たないコリネ菌を出発菌株とし、遺伝子組換えと変異による選択を組み合わせることで、Pol 合成能を獲得した目的株を選抜した。その戦略は、本菌が合成するパルミトイル（Pal）-CoA（C16:0）を不飽和化して Pol-CoA に変換しようとするものである。その手順は、まず、外来の acyl-CoA Δ9-desaturase 遺伝子（*desBC*）を導入して、Pol 合成経路を創出する。次いで、*desBC* が機能発現して狙い通りの代謝変換（Pal-CoA→Pol-CoA）が成立したと思われる目的株をポジティブ選抜する。その選抜では、コリネ菌が膜形成に本来のオレイン酸（C18:1Δ9）でなく、Pol でも代替可能な性質を利用した。すなわち，オレイン酸合成経路を遮断したコリネ菌を宿主とすれば、Pol 合成経路が作動した目的株を，オレイン酸フリー培地で生育してくるサプレッサー株として選抜できる。実際、*desBC* を導入しただけでは Pol 合成経路は作動せず、その選抜を交えることで目的株を取得できた。今回、その代表株 M-1 を用い、Pol 生産能には、*desBC* に加えて、どのようなサプレッサー変異が関わっているのかを解析した。 M-1 株を全ゲノム解析に供した結果、グローバルレギュレーター遺伝子 *dtxR* に変異を見出した。本レギュレーターは鉄の利用に関わることが報告されている。この知見と、DesBC が鉄依存酵素であることを考え合わせれば、DesBC への鉄供給に同変異が一役買っていると考えられる。鉄は元来、使用培地に含まれるが、その培地に鉄をヘミンの形態でさらに添加すると、*desBC* プラスミドの保有株は同変異に非依存的にオレイン酸フリー培地で生育することがわかった。以上から、コリネ菌では、*desBC* の導入と鉄の効率的利用という 2 条件が満たされて初めて Pol 生産が可能になることが示された。

We engineered a *Corynebacterium glutamicum* palmitic acid producer into a palmitoleic acid producer by introduction of the heterologous *desBC* genes and subsequent positive selection of the intended suppressor mutant. In this study, we identified the suppressor mutation and demonstrated that increased availability of iron was crucial for the functional expression of the *desBC* gene products that allow the desired metabolic conversion.

Corynebacterium glutamicum, palmitoleic acid production, iron availability

発表責任者：池田正人（m_ikeda@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：3A01-13
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:00～ ミーティングルーム A

コリネ型細菌によるデチオビオチンの生産

Engineering of *Corynebacterium glutamicum* for dethiobiotin production

○原 志門、竹野 誠記、池田 正人（信州大農）
○Shimon HARA, Seiki TAKENO, Masato IKEDA (Shinshu Univ.)

我々は、アミノ酸発酵微生物のコリネ菌がただ一つの遺伝子変異で糖から長鎖脂肪酸を分泌生産することを見出し、本菌に長鎖脂肪酸生産菌としてのポテンシャルがあることを報告した[1)]。その脂肪酸のカーボンを中鎖のジカルボン酸であるピメリン酸に向けることができることも示した[2)]。今回、そのピメリン酸からビオチン経路への代謝変換を試みた。

ピメリン酸のカーボンをビオチンに向けるには、ピメリン酸の CoA 化を担う *bioW* に加え、ピメロイル CoA からビオチンに至る 4 段の反応を担う *bioFADB* の計 5 種の遺伝子が必要である。その遺伝子源として、コリネ菌に加え、過去にビオチン生産菌の育種実績をもつ枯草菌と大腸菌を用いた。コリネ菌には元来 *bioW* と *bioF* がなく、大腸菌には *bioW* がない。それら欠落遺伝子は枯草菌遺伝子で補って、コリネ型、大腸菌型、そして枯草菌型のオペロンをそれぞれプラスミド上で構築し、ピメリン酸生産菌に導入した。グルコース培養で、いずれのオペロン導入株でも、カーボンはビオチン合成の中間体（KAPA, DAPA, デチオビオチン）として滞留し、その副生プロフィルは三者三様であった。その長短所に基づき、有効遺伝子を組み合わせたハイブリッドオペロンを造成した。その導入株では、KAPA および DAPA の副生が抑えられて、カーボンをデチオビオチンまで流すことができた。

一方、生物界に広く存在するビオチンプロテインリガーゼ（BirA）は、ビオチンをビオチン酵素（ピルビン酸カルボキシラーゼやアセチル-CoA カルボキシラーゼ）に連結する酵素である。大腸菌ではビオチンオペロンのリプレッサーとしても働くが、コリネ菌ではそのリプレッサー機能はないとされる。しかし、今回、コリネ菌の BirA にもリプレッサー機能があることを示唆する知見を得た。その結果についても紹介したい。

1) Appl Environ Microbiol **79:**6776 (2013), 2) ibid. 83**,** e01322-17 (2017)

We have so far reported fatty acid production by *Corynebacterium glutamicum* and its conversion into pimelic acid production. In this study, the pimelic acid producer was further converted to a dethiobiotin producer by introducing the artificially-constructed hybrid *bio* operon consisting of the endogenous and heterologous genes. A finding regarding the possible function of the biotin protein ligase BirA in this organism will also be presented.

Corynebacterium glutamicum, dethiobiotin production, BirA

発表責任者：池田正人（m_ikeda@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：3A01-14
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:00～ ミーティングルーム A

デオキシリボヌクレオチド生合成経路遺伝子を破壊した大腸菌の生育評価

Growth evaluation of Escherichia coli with knockout of deoxyribonucleotide synthetic pathway genes

○出口 賢児[1]、斯 大勇[1]、堀之内 伸行[1]、小園 祥子[1]、竹内 道樹[1]、日比 慎[1,2]、Anthony M. poole[3]、小川 順[1] ([1]京大院農、[2]富山県立大工、[3]オークランド大学)
○ Kengo DEGUCHI[1], Dayong SI[1], Nobuyuki HORINOUCHI[1], Syoko KOZONO[1], Michiki TAKEUCHI[1], Makoto HIBI[1,2], M. poole Anthony[3], Jun OGAWA[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Toyama Prefectural Univ., [3]The Univ. of Auckland)

地球上のすべての生物は、ribonucleotide reductase (RNR)が触媒するリボヌクレオチドの還元反応により DNA の構成分子としてデオキシリボヌクレオチドを酵素合成する。そのため、原始地球上に RNA が最初に存在したと仮定する RNA ワールド仮説では、RNA から DNA が誕生したとされている。しかし、我々は可逆的なヌクレオシド分解系として知られる DERA 経路の各酵素の機能を活用することで、RNR 経路を介することなくデオキシリボヌクレオシドの生合成が可能となることを見いだした。そのため、RNR を経由しない経路のみでデオキシリボヌクレオシドを、ひいては DNA を合成し、生育する生物を見出すことが出来れば、DNA は RNA からのみではなく独自に生合成されていた可能性を示すことができる。

現在、大腸菌をモデル生物として用い、大腸菌の三組の RNR 酵素遺伝子(*nrdAB, nrdEF, nrdDG*)を全て破壊した、3Δ 株の構築に成功している。そして、本 3Δ 株は生育において、デオキシリボヌクレオシドのうち、デオキシシチジンを要求し、また、数種のビタミン類を必要とすることが分かった。

All organisms on the earth enzymatically synthesize deoxyribonucleotides as constituent molecules of DNA by the reduction of ribonucleotides catalyzed by ribonucleotide reductase (RNR). Therefore, the RNA world hypothesis, which assumes that RNA first existed on the primitive earth, states that DNA was born from RNA. However, we have found that it is possible to biosynthesize deoxyribonucleosides without going through the RNR pathway by utilizing the function of enzymes in the DERA pathway known as a nucleoside degradation system. Therefore, if we can find an organism that synthesizes deoxyribonucleotides only through a pathway that does not go through RNR and grows, it can suggest that DNA was de novo synthesized through original pathway, not only from RNA.

Currently, using *Escherichia coli* as a model organism, we have succeeded in constructing a 3Δ strain in which all three sets of RNR enzyme genes (*nrdAB, nrdEF, nrdDG*) of *E. coli* are disrupted. We found that this 3Δ strain requires deoxycytidine as a nuceloside, together with some for its growth.

DNA, deoxyribonucleotide synthetic pathway, growth evaluation

発表責任者：小川順（ogawa.jun.8a@kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3A01-15
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:00～ ミーティングルーム A

放線菌において培養温度が一次代謝産物の生産に与える影響

Effect of temperature on production of primary metabolites in *Streptomyces lividans*

○内倉 寛斗[1]、山本 省吾[2]、山田 佑樹[2]、曽田 匡洋[2]、柘植 陽太[1,3] ([1]金沢大院・自科、[2]長瀬産業株式会社、[3]金沢大・新学術)
○Hiroto Uchikura[1], Shogo Yamamoto[2], Yuuki Yamada[2], Masahiro Sota[2], Yota Tsuge[1,3] ([1]Kanazawa Univ. Natural System, [2]NAGASE & CO., LTD., [3]Kanazawa Univ. InFiniti)

放線菌は抗菌、抗真菌、抗腫瘍薬などに利用される多種多様な二次代謝産物を生産する有用微生物である。しかし、放線菌に関する研究は二次代謝に注目したものが多く、一次代謝についての研究は進んでいない。温度は微生物を用いた物質生産に重要な要素である。通常、物質生産では増殖至適温度を用いて生産が行われるが、ターゲット化合物ごとに最適な生産温度が存在する可能性がある。そこで本研究では放線菌の一次代謝に関する基礎的な知見を得ることを目的として、*Streptomyces lividans* において培養温度が一次代謝産物の生産に与える影響を検証した。

S. lividans 1326 株を試験菌株として、TSB 培地にてグルコースを糖源として 96 h の培養を行った。培養温度は一般的に放線菌を培養する際に用いられる 28 ℃ に加え 24 ℃, 32 ℃, 36 ℃, 40 ℃, 44 ℃ に設定した。また 28 ℃, 36 ℃, 40 ℃ については 336 h の長時間培養試験も行った。サンプリングは 24 h 毎に行い、高速液体クロマトグラフィーを使用し培養液中のグルコースとトレハロース、α-ケトグルタル酸、リブロ―スの濃度を測定した。その結果、グルコース消費速度は 24 ℃ から 40 ℃ までは温度が高くなるにつれて増加したが、44 ℃ では著しく減少した。トレハロースと α-ケトグルタル酸の生産量は 36 ℃ で最大となり、長時間培養でトレハロースは 14.5 g/L、α-ケトグルタル酸は 8.1 g/L 生産し、28 ℃ のそれぞれ 2.6 倍と 2.2 倍に増加した。一方、リブロ―スの生産量は 40 ℃ で最大となり（18.3 g/L）、28 ℃ の 4.3 倍に増加した。以上の結果から、放線菌では培養温度によって一次代謝物生産の挙動が大きく異なることが明らかになった。

Streptomyces are well known to produce a wide variety of secondary metabolites, which can be used as antibacterial and antifungal agents. Temperature is an important factor for microbial production of useful chemicals. In this study, we examined the effect of temperature on the production of primary metabolites in *Streptomyces lividans*. As a result, glucose consumption rate increased with increasing temperature from 24 ℃ to 40 ℃, but decreased significantly at 44 ℃. Production of trehalose and α-ketoglutarate was maximized at 36 ℃, the values were 2.6 and 2.2-fold higher than that at 28 ℃, respectively. In contrast, production of ribulose was maximized at 40 ℃, the value was 4.3-fold higher than that at 28 ℃. These results showed that the production of primary metabolites in *S. lividans* differed greatly depending on reaction temperature.

Streptomyces lividans, temperature, primary metabolite

発表責任者：柘植陽太（ytsuge@staff.kanazawa-u.ac.jp）

講演番号：3A03-01
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:00～ ミーティングルーム A

Lactobacillus plantarum PUK6 の多成分バクテリオシン生合成関連遺伝子群の分子解析

Molecular analysis of the genes involved in the multiple bacteriocins production in *Lactobacillus plantarum* PUK6.

○河原 あい[1]、志賀 梨沙[2]、善藤 威史[3]、松崎 弘美[1,2]（[1]熊本県大院環境共生、[2]熊本県大環境共生、[3]九大院農）
○Ai KAWAHARA[1], Risa SHIGA[2], Takeshi ZENDO[3], Hiromi MATSUSAKI[1,2] ([1]Grad. Sch. Environ. Sym. Sci., Pref. Univ. Kumamoto, [2]Fac. Environ. Sym. Sci., Pref. Univ. Kumamoto, [3]Grad. Sch. Agric., Kyushu Univ.)

【目的】食経験豊富な乳酸菌が生産する抗菌ペプチドのバクテリオシンは、食品の風味に影響を与えず、ヒトの腸管内の消化酵素で分解されるなど安全性が高いことから、天然の食品保存料として期待されている。本研究では、熊本県球磨地方の伝統的発酵食品「味噌漬け豆腐」から分離した *Lactobacillus plantarum* PUK6 が生産する多成分バクテリオシンを精製・同定し、バクテリオシン生合成関連遺伝子群の塩基配列を決定および分子解析を行うことを目的とした。
【方法および結果】*L. plantarum* PUK6 の培養液上清について、70%飽和硫安分画、透析（MWCO 1,000）、逆相 HPLC を用いてバクテリオシンを精製した。HPLC による活性ピークのアミノ酸配列分析と相同性を示すバクテリオシン遺伝子に特異的なプライマーを用いて PCR を行った結果、plantaricin A, NC8 および EF の構造遺伝子を見出した。さらにプライマーウォーキングによって、PUK6 株の plantaricin 生合成関連遺伝子群 *pln* locus（約 20 kb）の塩基配列を決定した。また、PUK6 株 *pln* locus 上の遺伝子について、InterPro を用いたドメイン解析を行った結果、複数の推定 plantaricin 生合成関連遺伝子をさらに見出した。現在、各遺伝子の詳細な機能解析を進めている。

Bacteriocins are ribosomally synthesized peptides with antibacterial activities and are expected as food preservatives in food industry. *Lactobacillus plantarum* PUK6, isolated from misozuke-tofu, *tofu* pickled in *miso,* made in Kuma district of Kumamoto prefecture in Japan, produces multiple bacteriocins. The aim of this study was to purify the bacteriocins of strain PUK6 and identify the genes encoding multiple bacteriocins.

The bacteriocins were purified by ammonium sulfate precipitation (70% saturation), dialysis, Sep-Pak plus tC_{18} and reverse-phase HPLC from the culture supernatant of strain PUK6. The amino acid sequences of the three purified bacteriocins had homologies with those of plantaricin A, plantaricin EF and plantaricin NC8. The genomic DNA of strain PUK6 was used as a template for PCR. After additional PCR and primer walking, the biosynthesis genes (*pln* locus) containing the three bacteriocin structural genes of strain PUK6 were completely sequenced. Finally, the *pln* locus (ca. 20 kb) in *Lb. plantarum* PUK6 were identified. In addition, some unknown open reading frames probably involved in the biosynthesis of plantaricins have been found in the *pln* locus by analysis of InterPro protein database.

lactic acid bacteria, *Lactobacillus plantarum*

発表責任者：松崎弘美（matusaki@pu-kumamoto.ac.jp）

講演番号：3A03-02
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:00～ ミーティングルーム A

乳酸菌が生産する新奇バクテリオシンおよび抗菌タンパク質の探索と構造・特性の解析

Screening of novel bacteriocins and antibacterial proteins produced by lactic acid bacteria and analysis of their structure and characteristics

野見山 泰成、山城 圭輔、桑原 美空、中山 二郎、園元 謙二、○善藤 威史（九大院・農）
Taisei NOMIYAMA, Keisuke YAMASHIRO, Miku KUWAHARA, Jiro NAKAYAMA, Kenji SONOMOTO, ○Takeshi ZENDO (Fac. Agric., Kyushu Univ.)

乳酸菌が生産するバクテリオシン等のタンパク質性抗菌物質は、優れた特性や安全性から、食品や医療分野への応用が期待される。本研究では、新たな特性をもつ抗菌物質を生産する乳酸菌を探索し、その構造や特性を明らかにすることを目的とした。様々な分離源から乳酸菌を単離し、抗菌活性を評価したところ、バクテリオシン活性を示す種々の乳酸菌が得られた。その中でも、ツユクサから分離した乳酸菌 *Weissella minor* COM 株の培養液上清は、これまでに例のない特徴的な抗菌スペクトルを示した。そこで、培養液上清から抗菌物質を精製し、質量分析およびエドマン分解による構造解析を行ったところ、2 つの新奇バクテリオシン様抗菌タンパク質が確認された。続いて、*W. minor* COM 株のドラフトゲノム解析により、これらをコードする 2 つの遺伝子を特定し、それぞれの全アミノ酸配列を決定することができた。2 つの遺伝子は隣接して存在し、周辺には生合成への関与が予想される遺伝子群が見出された。2 つの新奇抗菌タンパク質は、ともに大きさは約 30,000 Da で、一部の配列が重複していた。構造から両者は溶菌酵素に類似した活性をもつことが予想され、作用機構の解析の結果、実際に溶菌活性を示すことが確認された。

Based on their properties and safety, antimicrobial peptides and proteins such as bacteriocins produced by lactic acid bacteria (LAB) are expected to be applied as food preservatives and pharmaceutical agents. The purpose of this study was to search for LAB strains that produce antibacterial substances with new properties and to clarify their structures and properties. LAB isolates from various sources were evaluated for their antimicrobial activity, and some were found to show bacteriocin-like inhibitory activity. Among them, the culture supernatant of *Weissella minor* COM, a LAB isolate from a dayflower, showed a characteristic antimicrobial spectrum. Two antimicrobial substances were purified from the culture supernatant, and their structural analysis by the mass spectrometry and Edman degradation showed they were novel bacteriocin-like antimicrobial proteins. Subsequently, draft genome analysis on the strain COM identified the genes encoding the proteins. The two novel antimicrobial proteins were both about 30,000 Da in size and had some sequence overlaps. As the structures predicted, their lytic activity was observed.

bacteriocin, antimicrobial protein, lactic acid bacteria

発表責任者：善藤威史（zendo@agr.kyushu-u.ac.jp）

講演番号：3A03-03
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:00～ ミーティングルーム A

発酵食品由来乳酸菌におけるフェルラ酸エステラーゼ活性

Feruloyl esterase activities in lactic acid bacteria from fermented foods

○矢野 嵩典、野田 健太、徳永 陽花、三井 亮司（岡山理大理）
○Takanori YANO, Kenta NODA, Haruka TOKUNAGA, Ryoji MITSUI (Okayama Univ. of Sci.)

乳酸菌には植物由来の物質から機能性化合物（フェルラ酸などのフェニルプロパノイド）を遊離する能力、すなわちフェルラ酸エステラーゼ（FAE）活性を有するものが存在する。本研究では発酵食品由来乳酸菌から FAE 生産菌を選抜した。

培養プレート上でクリアゾーン生成の有無により FAE 活性（モデル基質のフェルラ酸エチルからフェルラ酸が遊離する活性）を評価した。NBRC より入手した発酵食品由来乳酸菌の RD 株（スクリーニング株）115 株、市販の生みそ・キムチから分離した培養性状などで乳酸菌と推定される 50 株を調査対象とした。結果として RD 株からは 11 株、研究室分離株からは 19 株の FAE 生産性乳酸菌を見いだした。16S rRNA 遺伝子配列解析により *Companilactobacillus*（旧 *Lactobacillus*）*alimentarius* または *Pediococcus inopinatus* と同定された試験菌株はグルコースを含まない培地であっても FAE 活性を示した。*C. alimentarius* と同定された菌株にはカフェ酸を生成するクロロゲン酸およびロスマリン酸の分解活性が確認できた。研究室分離株であるキムチ由来 *C. alimentarius* KH4 においてゲノム上に 2 種類の FAE と考えられる酵素遺伝子（単機能性の FAE、二機能性の FAE/タンナーゼ）を見いだした。現在、これら FAE 候補遺伝子のリコンビナント酵素を取得する実験を進めている。

Some lactic acid bacteria (LAB) possess feruloyl esterase (FAE) activities, which are necessary for releasing functional compounds (phenylpropanoids such as ferulic acid) from plant substances. In this study, FAE-producing strains were screened from LAB isolated from fermented foods.

Plate screen was performed to assess FAE activities. The hydrolysis of ethyl ferulate by FAE forms clear zones around the colonies on the culture plates. One hundred and fifteen LAB strains isolated from fermented foods provided by NBRC (NBRC RD strains) and 50 original isolates from miso and kimchi were used for the screening. As the results, 11 and 19 strains were selected as FAE-producing LAB from NBRC RD strains and the original isolates, respectively. The strains, identified as *Companilactobacillus* (formerly *Lactobacillus*) *alimentarius* or *Pediococcus inopinatus* by 16S rRNA sequence analysis, showed FAE activities even under glucose omitted conditions. *C. alimentarius* strains showed the degradation of chlorogenic acid and rosmarinic acid to form caffeic acid. Two types of genes probably encode FAE (monofunctional FAE, bifunctional FAE/tannase) was found in *C. alimentarius* KH4, which was isolated from kimchi in our laboratory. Several experiments for obtaining the recombinant enzymes of these target genes are ongoing.

Feruloyl esterase, Lactic acid bacteria, Fermented foods

発表責任者：矢野 嵩典（tyano@dbc.ous.ac.jp）

講演番号：3A03-04
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:00～ ミーティングルーム A

Aeromonas hydrophila における低電位電極からの電子を利用した還元的代謝

Use of electrons from low-potential electrodes for reductive metabolic reactions in *Aeromonas hydrophila*

○土屋 美愉、高妻 篤史、渡辺 一哉（東薬大生命）
○Miyu TSUCHIYA, Atsushi KOUZUMA, Kazuya WATANABE (Tokyo Univ. Pharm. Life Sci.)

電気制御発酵とは、電極を用いて細胞内の酸化還元反応を制御しながら発酵を行う技術である。従来の発酵法では生産の難しい化合物の生産や、電極からの電子により生成される NADH や ATP を供給しながらの物質生産が可能になると期待されている。電気制御発酵においては細胞外電子伝達系をもつ電気化学活性細菌を用いる必要があるが、最近の研究で、グルコースを基質とした発酵代謝を行う *Aeromonas hydrophila* が細胞外電子伝達系をもつことが発見された。そこで我々は *A. hydrophila* が電気制御発酵のホストに適していると考え、この細菌の代謝特性や電子受容能力の調査を行った。この菌をグルコース含有培地において低電位電極を挿入した電気化学セル内で培養したところ、培養開始から 80 時間を過ぎたころから電流が流れ始め、300 時間を過ぎた頃に最大のカソード電流が観測された。電流生成前後の代謝産物を測定したところ、電流生成前にはギ酸、酢酸、エタノール、コハク酸が検出されたものの、電流生成とともにギ酸と酢酸が減少し、乳酸が顕著に増加した。これらの結果は、*A. hydrophila* は低電位電極から受け取った電子を還元的代謝に利用できることを示しており、*A. hydrophila* が電気制御発酵のホストとして適していることを示唆している。

Electro-fermentation (EF) is a technology that utilize electrodes for controlling intracellular redox balances during fermentation. EF is expected to be applicable to the production of chemicals that are difficult to be synthesized by conventional fermentation and to the supply of NADH and ATP to biosynthesis pathways. We have considered that, in terms of its abilities for glycolytic fermentation and extracellular electron transfer, *A. hydrophila* is suitable as a host for EF, and this work investigated the metabolic characteristics and electron-accepting capacity of this bacterium. When *A. hydrophila* was cultured in bioelectrochemical cells in the presence of low-potential electrodes, cathodic currents were increased 80 hours after the start of cultivation and reached the maximum within approx. 300 hours. Metabolite analyses showed that formate, acetate, ethanol and succinate were detected before current generation. Formate and acetate were however decreased in association with cathodic current generation, and lactate was substantially produced instead. These results indicate that *A. hydrophila* is able to utilize electrons from low-potential electrodes for intracellular reductive metabolic reactions. Furthermore, the results suggest that *A. hydrophila* is suitable as a host for EF.

electro-fermentation, *Aeromonas hydrophila*, metabolites

発表責任者：土屋美愉（s168045@toyaku.ac.jp）

講演番号：3A03-05
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:00～ ミーティングルーム A

Bacillus cereus YB-4 由来ポリエステル重合酵素と分子シャペロンを共発現させた組換え大腸菌による 3-ヒドロキシブタン酸オリゴマーの分泌生産

Secretory production of (*R*)-3-hydroxybutyrate oligomer by recombinant *Escherichia coli* co-expressing polyhydoroxyalkanoate synthase derived from *Bacillus cereus* YB-4 and molecular chaperones

○後藤 早希[1,2]、宮原 佑宜[2,3]、山田 麻里子[1,2]、柘植 丈治[2,3]、廣江 綾香[1,2]（[1]東農大、[2]JST-MIRAI、[3]東工大院）

○Saki GOTO[1,2], Yuki MIYAHARA[2,3], Mariko YAMADA[1,2], Takeharu TSUGE[2,3], Ayaka HIROE[1,2]（[1]Tokyo Univ. of Agric., [2]JST-MIRAI, [3]Tokyo Tech.）

【背景および目的】生分解性ポリマーであるポリ−3−ヒドロキシブタン酸［P(3HB)］は、ポリヒドロキシアルカン酸（PHA）重合酵素により合成される。最近、PHA 重合酵素遺伝子を大腸菌に導入すると、細胞内に P(3HB)を蓄積するだけでなく、培地中に低～中分子の 3HB オリゴマー（3HBO）を分泌することが確認された（Miyahara et al., 2019）。3HBO は、末端に望みの官能基を本重合系で付加することで、ポリウレタンなど各種ポリマー基幹物質として利用できる付加価値の高い化合物である（Hiroe et al., 2020）。本研究では、効率的な 3HBO の分泌生産を達成するために、*Bacillus cereus* YB-4 由来の PHA 重合酵素と分子シャペロンの共発現効果を検討した。

【実験および結果】PHA 重合酵素遺伝子および分子シャペロン遺伝子を、大腸菌 BW25113 に導入して組換え株を作製し、2%グルコース含有 LB 培地で、30˚C、48 時間培養を行った。培養後、上清中に分泌された 3HBO 量および細胞内に蓄積した 3HBO 量を酵素法により測定した。その結果、重合酵素のみ導入した組換え株と比較して、シャペロンを共発現させた組換え株の 3HBO 生産量は向上した（約 2 倍）。また、組換え株から抽出した粗酵素液の重合酵素活性を測定した結果、酵素活性値も高くなる傾向がみられた。さらに、分子シャペロン共発現による重合酵素の可溶化促進効果を、pET 発現システムを利用して評価した。SDS-PAGE により、可溶性・不溶性画分を比較すると、シャペロン共発現株において、重合酵素の可溶化が増加していることを確認した。以上より、分子シャペロンを共発現させることにより、重合酵素の可溶化が促進され、オリゴマー生産量が増加したと推察された。

A biodegradable polyester, poly[(*R*)-3-hydroxybutyrate] [P(3HB)] is synthesized by polymerizing enzyme called polyhydroxyalkanoate (PHA) synthase. Recently, we demonstrated the secretory production of (*R*)-3HB oligomer (3HBO), low-molecular-weight P(3HB), by using recombinant *Escherichia coli* expressing PHA synthases. In this study, we examined an effect of co-expression of the PHA synthase derived from *Bacillus cereus* YB-4 ($PhaRC_{YB4}$) and molecular chaperons on 3HBO production. As a result, compared to unique expression of the PHA synthase, co-expression of molecular chaperon promoted the secretory production of 3HBO (approximately 2-folds). In *vitro* activity assay of whole-cell extract revealed that the enzyme activity of PHA synthase was increased when expressing of molecular chaperon. SDS-PAGE analysis also showed the increasing of the soluble fraction of PHA synthase. These results suggested that the utilization of chaperon protein is valuable approach to enhance the $PhaRC_{YB4}$ solubility and 3HBO productivity.

3-hydroxybutyrate oligomer (3HBO), PHA synthase, secretory production

講演番号：3A03-07
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:00～ ミーティングルーム A

ヨウ素含有廃水を処理する活性汚泥のユニークな微生物群集とヨウ素をめぐる種間相互作用

A unique microbial community found in activated sludge treating iodide-ion containing wastewater and inter-specific interactions over iodine

○松下 真由美[1,2]、青柳 智[1]、稲葉 稲葉[1]、堀 知行[1]、羽部 浩[1]、佐藤 由也[1]([1]産総研・環境創生、[2]学振 RPD)
○ Mayumi MATSUSHITA[1,2], Tomo AOYAGI[1], Tomohiro INABA[1], Tomoyuki HORI[1], Hiroshi HABE[1], Yuya SATO[1] ([1]AIST, [2]JSPS RPD)

【背景・目的】日々の生活や産業活動から生じる廃水は、活性汚泥と呼ばれる、数千種からなる微生物集団によって処理されている。化学工場から出る産業廃水には、製品の原材料である有機化合物や金属イオンなど、自然環境には少ない物質が多く含まれていることがあり、その処理を担う活性汚泥には、他では見られないユニークな微生物コミュニティが形成されている。本研究では、ヨウ化物イオン（I^-）含有化学工場廃水を処理する活性汚泥に着目し、その中に形成される微生物コミュニティの解明に取り組んだ。
【結果・考察】水質分析の結果、当該廃水は有機物濃度が低く、4～14 mg/L の I^-を含むことが分かった。次世代シークエンサーを用いて活性汚泥の微生物組成を解析したところ、低有機物条件を反映し、複数の C1 化合物資化性細菌（メチロトローフ）が優占化していることがわかった。また、I^-を分子状ヨウ素（I_2）へと酸化する、ヨウ素酸化細菌も主要微生物として検出された。I_2 は微生物に毒性を示すため、I_2 生成や炭素源の種類・濃度をめぐる微生物間相互作用に興味を持ち、主要微生物 5 種について単離株の培養実験を行った。結果、有機物濃度が高い場合は一般的な従属栄養性細菌が優占化するが、そこに I^-とヨウ素酸化細菌が共存することで I_2 毒性が生じ、従属栄養性細菌が抑制されることが分かった。一方、有機物量が少なく C1 化合物量が多い場合にはメチロトローフが有利であった。これらの結果から、今回解析対象とした実環境（活性汚泥）中では、有機物や C1 化合物および I^-濃度のわずかな変化に応じて各微生物の適応度（fitness）が左右され、優先化できる微生物種が決まっていることが示唆された。
Activated sludge, which is composed of numerous microorganisms, has been used for wastewater treatment for over 100 years. In this study, we investigated microbiome of the activated sludge from a treatment facility for iodide ion-containing chemical industrial wastewater by high-throughput sequencing to clarify its unique microbial community structures. We found several methylotrophic bacteria, which utilize C1 compounds as carbon sources, were dominant in the activated sludge, reflecting the oligotrophic environment. Further, an iodide oxidizing bacterium, which oxidizes iodide ion (I^-) to molecular iodine (I_2), was also found to be dominant. Since I_2 is toxic to bacteria, we were interested in unique microbial interactions in the activated sludge. To clarify the effects of organic matter concentrations and I_2 production on the microbial community structures, five dominant species were selected and co-cultured with various conditions.

activated sludge, inter-specific interaction, Iodide-oxidizing bacteria

発表責任者：佐藤　由也（yuya-satou@aist.go.jp）

講演番号：3A03-08
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:00～ ミーティングルーム A

嫌気性腸内細菌と腸上皮細胞の共培養を可能とするフロー型アピカル嫌気培養器の開発

A plug flow apical anaerobic incubation device that enables co-culturing of anaerobic microbes and intestinal epithelial cells

○後藤 愛那[1]、橋本 豊之[2]、米田 恭子[2]、藤山 陽一[2]、小関 英一[2]、加藤 紀彦[1]、田川 陽一[3]、金 倫基[4]、長谷 耕二[4]、片山 高嶺[1]([1]京大生命、[2]島津製作所基盤、[3]東工大生命理工、[4]慶応薬)
○Aina GOTOH[1], Toyoyuki HASHIMOTO[2], Yasuko YONEDA[2], Yoichi FUJIYAMA[2], Eiichi OZEKI[2], Toshihiko KATOH[1], Yoh-ichi TAGAWA[3], Yun-Gi KIM[4], Koji HASE[4], Takane KATAYAMA[1] ([1]Grad. Sch. of Biostud., Kyoto Univ., [2]Tech. Res. Lab., Shimadzu Co., [3]Life Sci. Tech., Tokyo Tech., [4]Grad. Sch. of Pharm. Sci., Keio Univ.)

腸内微生物叢は、共生やディスバイオシスを介して宿主の健康や疾病に大きな影響を及ぼす。我々は、この symbiosis/dysbiosis の分子基盤を理解するためには嫌気性腸内細菌と腸上皮細胞を使用したシンプルな *in vitro* 共培養システムが必要であると考えている。本研究では、単層化した上皮細胞の頂端膜（アピカル）側および基底膜側をそれぞれ嫌気環境および好気環境とすることが可能で、かつ、アピカル側培地を流動化させることの出来るフロー型アピカル嫌気培養器（SMZ-II）の開発を行った。

通常の CO_2 インキュベーター内で単層化させた Caco-2 細胞を SMZ-II にセットした後、嫌気チャンバー内に導入することでアピカル側を嫌気環境とした。小型ペリスタルリックポンプによりアピカル側培地を流動化させながら培養を行い、装置に設置した電極により経時的に経上皮電気抵抗値（TEER）を、また非接触型酸素濃度計により溶存酸素濃度をモニタリングした。 本講演では、装置の概略とともに、アピカル嫌気環境とした際の Caco-2 細胞のバリア機能の評価や嫌気性細菌との共培養結果について報告する。

Gut microbiota has a significant influence on host health and diseases. In order to decipher the underlying symbiotic and dysbiotic interactions between host and microbes, we considered that it is necessary to develop a simple *in vitro* system that enables co-culturing of obligate anaerobic microbes and intestinal epithelial cells. In this study, we develop a plug flow apical anaerobic incubation device (SMZ-II) that is able to maintain apical and basal sides of Caco-2 monolayer anaerobically and aerobically, respectively, simultaneously.

Caco-2 cells were first incubated in a cell culture insert in CO_2 incubator to form a monolayer. The cell culture insert with the polarized Caco-2 cells were then set to SMZ-II device, and the device was put into the anaerobic chamber to make the apical side anaerobic, while keeping basal side aerobic. The cells were incubated with an apical fluid flow, and the transepithelial electrical resistance (TEER) values as well as dissolved oxygen concentrations were measured with the electrode embedded in the device and the non-contact oxygen sensor, respectively. In this talk, we will first outline the structure of the device and then report the barrier function integrity of Caco-2 cells incubated under the apical aerobic conditions. In addition, we show the results obtained when the Caco-2 cells were co-cultivated with anaerobic bacteria.

anaerobic microbe, intestinal epithelial cell, co-culture

講演番号：3A03-09
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:00～ ミーティングルーム A

増殖の開始を制御する微生物間相互作用ー環境中の微生物コミュニティが織りなす増殖制御ネットワーク

Illuminating microbial growth controlling network in nature

○鈴木 陸太、ソ ウニョン、加藤 節、中島田 豊、青井 議輝 (広島大学)
○Rikuta Suzuki, Eunyoung Seo, Setsu Kato, Yutaka Nakashimada, Yoshiteru Aoi (Hiroshima Univ.)

環境中に存在するほとんどの微生物は培養できないことが知られている。我々は，1）非増殖状態の微生物が相互作用によって増殖状態に遷移する，2）微生物間相互作用を活性化することで多くの微生物の増殖を促すことができるという仮説をたて，それを検証することを目的とした。

従来の培養法では相互作用を活性化させるには植菌密度が低い。そこで我々は従来の 1 万倍以上もの初期植菌密度(10^6～10^7 cell/mL)で共培養することができる新たな培養法を開発した。これは W/O エマルジョンを作成する手順で,一細胞ずつ菌体を直径 10-30 μｍのゲルのドロップレットに封入し，ドロップレットを油中で凝集させた状態で培養する。これにより各々のクローンが培養期間中分離状態を保った状態で実環境中と同等の高い植菌密度での培養が可能となった。

上記培養法を用いて環境サンプルを培養した結果，従来法の寒天平板や相互作用の不活性な培養条件と比べ，十倍以上ものコロニーの生成を確認することができた。さらに土壌サンプルを培養し，獲得した分離株を用いて各菌体の相互作用による増殖特性の評価を行なったところ，特定の異種間または同種間における相互作用により，それらの増殖の開始が誘導されるという現象が確認された。以上の結果から，実環境中では，複雑な微生物間相互作用により，各々の微生物の増殖が制御されている「増殖制御ネットワーク」が形成されているという可能性が示唆された。

The aim of this study is to reveal microbial growth controlling network in nature. We established a new microbial cultivation platform providing extremely high inoculum cell density (>10^7 cells/ml) but keep individuality of each growth unit (single cells and micro-colonies). As a result of comparative experiment on colony formation using soil sample, the cultivation efficiency showed approximately 10 times higher than the condition without microbial interactions.

Next, selected isolates from above method were individually tested on recovery from dormancy under the same condition (GMD-oil cultivation) but co-cultured with other isolates (different species) or environmental samples. Cultivation efficiencies of tested isolates were significantly higher when co-cultured with specific isolates or environmental sample (mixed species) than pure-cultures. This suggests that microbial network controls growth of specific microbial type in nature.

microbial darkmatter, dormant, network

講演番号：3A03-10
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:00～ ミーティングルーム A

カーボンマイナス農業を可能にする植物炭土壌の創出

Development of charcoal soil that enables carbon-minus agriculture

○西田 亮也[1,2]、高野 雅夫[1]、宮本 憲二[3]、加藤 康夫[4]、安藤 晃規[5,6]、小川 順[5,6]、篠原 信[2]（[1]名大院環、[2]農研機構、[3]慶大理工、[4]富山県大・生医工研セ、[5]京大院農、[6]京大・生理化学研究ユニット）

○Ryoya NISHIDA[1,2], Masao TAKANO[1], Kenji MIYAMOTO[3], Yasuo KATO[4], Akinori ANDO[5,6], Jun OGAWA[5,6], Makoto SHINOHARA[2] ([1]Grad. Sch. of Env. Stud., Nagoya Univ., [2]NARO, [3]Dept. Biosci. Inform., Keio Univ., [4]Biotech. Res. Cent., Toyama Pref. Univ., [5]Div.Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [6]Res. Unit Physiol. Chem. Kyoto Univ.)

土壌創出技術は、並行複式無機化法（MPM, 篠原, 2006）を応用したもので、多孔質鉱物や人工樹脂等の多孔体に土壌由来微生物を固定化することにより、非土壌媒体中で有機物からの無機養分生成を実現している。本技術により、多孔体に植物炭を使用することで大量の炭素を土壌として利用でき、固定することができるため、温室効果ガスを削減していくカーボンマイナスな農業の実現が期待されている。そこで本研究は、植物炭土壌を用いた食料生産システムの確立に向けて、植物炭の土壌としての性能と栽培試験による生産性を評価することを目的とした。土壌担体となる植物炭として、もみ殻燻炭とヤシ殻活性炭を用いた。それらに対し、MPM 法により微生物を固定化することで土壌化（無機養分生成能（有機物を分解し無機養分を生成する機能）の付与）した。MPM 法は、1 日ごとに多孔体の洗浄と有機肥料の添加を行う手法で硝酸イオン生成が安定するまで繰り返した。加えて、それぞれの材料の物理的特性を分析することで無機養分生成能の要因を調査した。また、それぞれの土壌を用いたコマツナの栽培試験を行った。もみ殻燻炭、ヤシ殻活性炭のどちらも安定して硝酸イオンを生成する機能を付加することができた。加えて、どちらの材料も土壌化を施すことでコマツナが健全に生育することが分かった。本講演では、それぞれの植物炭の無機養分生成能の違いが生じる原因に関しての考察に加えて、様々な規模での栽培試験の結果や実用に向けた取り組みを紹介したい。

By applying a multiple parallel mineralization method (MPM, Shinohara,2006), which is the technique to enable the use of organic fertilizers in hydroponics, it has become possible to achieve nitrification in non-soil materials such as minerals and artificial resins. In this method, the porous carriers immobilized with microorganisms gains the ability to produce nitrate and inorganic nutrients from organic substances such as natural soil. By using charcoal as a porous carrier, a large amount of carbon can be fixed as soil, so it is expected to realize carbon farming that reduces greenhouse gases. Therefore, the purpose of this study was to evaluate the performance of charcoal to produce inorganic nutrients from organic matters and the productivity of cultivation tests toward the establishment of a food production system using processed charcoal. In this study, rice husk charcoal and coconut husk charcoal were used. In both materials, the formation of nitrate ions was confirmed by the MPM method. We also found that komatsuna grows healthy in both processed charcoals. In this presentation, I would like to introduce the results of cultivation tests on various scales and efforts for practical use, in addition to considering the causes of differences in soil performance and performance of each charcoal.

charcoal, nitrification, organic substances

発表責任者：篠原信（shsh@affrc.go.jp）

講演番号：3A03-11
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:00～ ミーティングルーム A

アミノ酸および誘導体による根の成長にあたえる影響の解析

Analysis of the effects of amino acids and derivatives on root growth

○黄 穎[1]、篠原 信[2]、加藤 康夫[3]、安藤 晃規[4,5]、小川 順[4,5]、宮本 憲二[1] ([1]慶大・理工、[2]農研機構、[3]山県大・生医工研セ、[4]京大院農・応用生命、[5]京大・生理化学)
○ YING HUANG[1], MAKOTO SHINOHARA[2], YASUO KATO[3], AKINORI ANDO[4,5], JUN OGAWA[4,5], KENJI MIYAMOTO[1] ([1]Dept. Biosci. Inform., Keio Univ., [2]NARO, [3]Biotechnol. Res. Cent., Toyama Pref. Univ., [4]Div. Appl. Life. Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ, [5]Res. Unit Physiol. Chem. Kyoto Univ.)

有機質肥料活用型養液栽培では植物の根圏にバイオフィルムと呼ばれる微生物の群集構造が形成される。バイオフィルムの存在により有機物の硝化から植物への栄養供給までの流れが効率的に行われることや、植物の根の成長促進や病害抑制など興味深い現象が確認されている。先行研究では、バイオフィルムからトリプトファン(L-Trp)をタバコの根の成長促進物質として単離同定に成功した。本研究では、L-Trpの誘導体（7種）および19種アミノ酸を用いて、タバコの成長に対する影響を調べた。
滅菌したサムスンタバコ（*Nicotiana tabacum L. cv.* Samsun) の種子を各化合物が含む寒天培地に播種し、12 日間無菌栽培した。そして、タバコの重量、主根長と側根数を測定し、化合物の活性を評価した。その結果、D-Trp は L-Trp より弱い活性を、L-Trp のエステル誘導体は L-Trp と同程度の活性を示した。19 アミノ酸の中、Met、Val および Glu に促進効果が見られたが、いずれも Trp より効果が弱かった。また、19 アミノ酸それぞれを L-Trp と同時に培地に添加し、それらの相乗効果を調べたところ、全てのアミノ酸に Trp との相乗効果が多少見られた。興味深いことに、単独で促進活性を示さないアミノ酸、例えば Gln、Gly、Thr には、Met と Val より強い相乗効果が見えた。

Organic hydroponics is new technique which can use organic fertilizers in hydroponic system. In the water, microbial communities (called biofilm) form on plant’s root and they perform nitrification of organic compounds and providing nourishment to plants effectively. Furthermore, by forming of biofilm, growth of lateral roots and root hair is promoted. In our previous study, we successfully isolated and identified L-Trp as the root growth promoting compound from biofilm.
In this study, we analyzed the effects of 7 derivatives of L-Trp and 19 amino acids on root growth of tobacco (*Nicotiana tabacum L. cv.* Samsun), by measuring the weight, primary root length and lateral root number. In 7 derivatives, D-Trp showed weaker effect than L-Trp, ester derivatives showed the same effects as L-Trp. In 19 amino acids, Met, Val and Glu showed promotion effect, all of which were weaker than L-Trp. However, when tobacco was co-treated with each amino acid and L-Trp, the multiplier effect was observed in all 19 animo acids. Interestingly, Gln, Gly and Thr which did not promote root growth alone, showed stronger multiplier effect with L-Trp than Met and Val.

tobacco, tryptophan, amino acid

講演番号：3A03-12
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:00～ ミーティングルーム A

酵母 D-アスパラギン酸オキシダーゼ機能発現におけるピルビン酸カルボキシラーゼの機能解析

The functional analysis of pyruvate carboxylase in the functional expression of D-aspartate oxidase in yeast

○今西 大生、財津 奏太、高橋 祥司（長岡技大院工）
○Daiki IMANISHI, Souta ZAITSU, Shouji TAKAHASHI (Nagaoka Univ. of Tech.)

【背景・目的】真核生物において，D-アミノ酸は主にペルオキシソームに局在する FAD 含有酵素である D-アスパラギン酸オキシダーゼ（DDO）と D-アミノ酸オキシダーゼ（DAO）により分解代謝される．両酵素は，高いアミノ酸配列同一性を有することから，同一祖先から分岐したと考えられている．酵母では，DAO のペルオキシソームへの輸送や活性化にピルビン酸カルボキシラーゼ（Pyc1p）の関与が示唆されているが，DDO への関与は不明である．酵母 *Cryptococcus humicola* UJ1 株の DDO（ChDDO）は D-Asp に対して高い特異性と触媒活性を有し，培養液中の D-Asp の存在により誘導発現することが知られているが，その発現機構は明らかにされていない．そこで本研究では，UJ1 株の *PYC1* 遺伝子破壊を通して，*ChDDO* 遺伝子の機能発現における Pyc1p の関与を調査した．

【方法・結果】blastp によって UJ1 株のゲノム配列における *PYC1* 遺伝子を探索したところ，真菌 Pyc1p に対して高い配列類似性を有するタンパク質をコードする遺伝子遺伝子を 1 つ見いだした. UJ1 株の *PYC1* 遺伝子破壊株（*Δpyc1*）を作製し，D-Asp を唯一の窒素源とした培地でその生育を観察したところ，野生株と比べて生育が著しく遅延した．また，D-Asp 誘導時における DDO 活性が *Δpyc1* 株において大きく減少した．このことから，Pyc1p が *ChDDO* 遺伝子発現に関与することが示唆された．現在，Pyc1p の機能と *ChDDO* 遺伝子発現の詳細な関係について解析を進めている．

【Background・Purpose】In eukaryotes, D-amino acids are mainly metabolized by the FAD-containing peroxisomal enzymes D-aspartate oxidase (DDO) and D-amino acid oxidase (DAO). Because of their high amino acid sequence identity, the enzymes are considered to be derived from the same ancestor. In yeast, pyruvate carboxylase (Pyc1p) is suggested to be involved in the transport and activation of DAO, whereas the involvement in those of DDO is unknown. DDO (ChDDO) of the yeast *Cryptococcus humicola* strain UJ1 is known to be inducibly expressed by the presence of D-Asp in culture medium, but the expression mechanism is unclear. In this study, we investigated the involvement of Pyc1p in the functional expression of *ChDDO* gene through *PYC1* gene disruption in strain UJ1.

【Methods・Results】We search for *PYC1* gene in the genome sequence of strain UJ1 using blastp and found a gene encoding a protein with high similarity to fungus Pyc1p. We generated a *PYC1*-gene disrupted strain (*Δpyc1*) of strain UJ1 and analyzed the growth on D-Asp as the sole nitrogen source. As a result, the growth of *Δpyc1* was significantly retarded on D-Asp compared to that of the wild-type but not on L-Asp. In addition, the induction of DDO activity by D-Asp was significantly decreased in *Δpyc1* strain. These results suggested that Pyc1p might be involved in the functional expression of *ChDDO* gene. We are now analyzing the details of the relation between the function of Pyc1p and *ChDDO* gene expression.

D-aspartate oxidase, pyruvate carboxylase, *Cryptococcus humicola* UJ1

講演番号：3A03-13
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:00～ ミーティングルーム A

黒麹菌 *Aspergillus luchuensis* のニゲラン合成酵素遺伝子群の同定と機能解析

Identification and characterization of nigeran synthesis-related genes from *Aspergillus luchuensis*

○上地 敬子、渡嘉敷 直杏、平良 東紀、水谷 治（琉球大農）
○Keiko UECHI, Jikian TOKASHIKI, Toki Taira, Osamu MIZUTANI (Univ. of the Ryukyus)

Aspergillus 属や *Penicillium* 属の一部の糸状菌は，窒素源飢餓時にニゲランという細胞壁多糖を特異的に生産することが知られている。ニゲランは，D-グルコースが α-1,3-と α-1,4-結合を交互に繰り返す直鎖状の構造をとる。現在までに糸状菌におけるニゲランの生合成機構やその生理学的な意義についての知見はほとんどない。我々は，ニゲラン生産能が確認されている *Aspergillus luchuensis* を窒素源含有あるいは非含有条件下で培養し，RNA-seq 解析を実施した。窒素源飢餓時に特異的に発現量が上昇する遺伝子から，推定 α-1,3-グルカン合成酵素遺伝子（*AlagsB*）とこれに隣接する α-グルカノシルトランスフェラーゼ遺伝子（*AlagtC*）と機能未知遺伝子（*gnsA*）をニゲラン合成酵素関連遺伝子であると推測した。これらのニゲラン合成関連酵素候補遺伝子を対象として RT-PCR 解析，遺伝子破壊試験，遺伝子相補試験を行い，*AlagsB* がニゲラン合成酵素遺伝子をコードすることを明らかにした。また，*AlgtC* と *gnsA* が菌糸中のニゲラン含量に影響を与えること，*AlagtC* がニゲランの分子量制御に関連していることを明らかにした。

Some filamentous fungi of *Aspergillus* and *Penicillium* spp. specifically produce one of the cell wall polysaccharides called nigeran, which is an unbranched D-glucan consisting of alternating α-1,3- and α-1,4-glucoside linkages, under the nitrogen-starved conditions. The synthesis mechanism and the physiological effects of nigeran for survival have been unclear. In this study, to identify the nigeran synthase gene in *Aspergillus luchuensis*, a nigeran producing filamentous fungi, we performed RNA-seq analysis under the presence of nitrogen source or not. The gene expression level of a putative α-1,3-glucan synthase (*AlagsB*) was specifically up-regulated under the nitrogen-starved condition. In addition, the α-glucanosyltranseferase gene (*AlagtC)* and the hypothetical protein coding gene (*gnsA*) adjacent A*lagsB* were also up-regulated mRNA expression level same to *AlagsB*. We predicted these genes were relating nigeran synthesis. From the results of RT-PCR, gene disruption, and gene complementation test, the *AlagsB* was revealed to encode nigeran synthase not α-1,3-glucan synthase. Furthermore, it was clarified *AlagtC* and *gnsA* affect the nigeran content in hyphae and *AlagtC* is involved in the molecular weight regulation of nigeran.

Nigeran, α-1,3-glucan, fungal cell wall polysaccharides

発表責任者：上地敬子（k-uechi@agr.u-ryukyu.ac.jp）

講演番号：3A03-14
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:00～ ミーティングルーム A

麹菌におけるカーボンカタボライト抑制を制御する脱ユビキチン化酵素 CreB によるアレスチン様タンパク質 CreD の発現制御

Expression of the arrestin-like protein CreD is regulated by CreB, a deubiquitinating enzyme that regulates carbon cataborite repression in *Aspergillus oryzae*

○田中 瑞己[1]、藤田 翔貴[2]、河原崎 泰昌[1]、新谷 尚弘[2]、五味 勝也[2] ([1]静県大食栄、[2]東北大農)
○Mizuki TANAKA[1], Shoki FUJITA[2], Yasuaki KAWARASAKI[1], Takahiro SHINTANI[2], Katsuya GOMI[2] ([1]Univ. Shizuoka, [2]Tohoku Univ.)

麹菌のカーボンカタボライト抑制（CCR）制御因子として、脱ユビキチン化酵素 CreB とユビキチンリガーゼのアダプターとして機能するアレスチン様タンパク質 CreD が同定されている。アミラーゼ遺伝子の CCR は *creB* の破壊によって解除されるが、この CCR 解除は *creD* の破壊により打ち消されることが明らかとなっている。そのため、CreB と CreD は CCR の制御において相反する役割を担っていると考えられるが、CreB と CreD の関係性については明らかとなっていない。本研究では CreD のタンパク質量の制御における CreB の関与について解析を行った。
野生株における CreD のタンパク質量を調べた結果、グルコースを炭素源とした場合に著しく増加した。一方、*creB* 破壊株においてはグルコースを炭素源とした場合にも CreD タンパク質量の増加は見られなかったが、CreD のユビキチン化部位に変異を導入することでグルコース存在下における CreD タンパク質量が増加した。また、構成的に発現するプロモーターを用いて CreD を発現させた場合にも同様の結果が得られたことから、CreD のタンパク質量は CreB 依存的に翻訳後レベルで制御されていることが示唆された。一方、*creD* の転写発現量を調べた結果、野生株ではグルコースによって発現が誘導されたのに対し、*creB* 破壊株では誘導されなかった。以上の結果から、CreD の発現量は翻訳後レベルと転写レベルの両方において CreB 依存的に制御されていることが示唆された。
In the presence of glucose, expression of amylase gene is repressed by carbon catabolite repression (CCR) in *Aspergillus oryzae*. The protein level of CreD, an arrestin-like protein involved in CCR regulation, is varied depending on the carbon source. In this study, we analyzed the regulation of CreD protein level.
The protein level of CreD in wild-type strain was significantly increased when glucose was used as a carbon source. In the disruption mutant of *creB*, encoding a deubiquitinating enzyme involved in CCR regulation, CreD protein level was not increased by glucose, whereas mutation of CreD ubiquitination sites increased CreD protein level. These profiles of CreD protein level were also observed when *creD* was driven by a constitutive promoter. On the other hand, although expression of *creD* gene was induced by glucose, it was not induced in the *creB* disruptant. These results suggested that CreD expression level is regulated in a CreB-dependent manner at both post-translational and transcriptional levels.

Aspergillus oryzae, Carbon catabolite repression, Ubiquitin

発表責任者：田中　瑞己（mizuki.tanaka@u-shizuoka-ken.ac.jp）

講演番号：3A03-15
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:00～ ミーティングルーム A

麹菌の転写因子破壊株ライブラリーを利用した細胞壁構成成分の生合成制御因子の探索

Identification of Biosynthetic Regulators for Cell Wall Components by Screening a Disruptant Library for Transcription Factors in Aspergillus oryzae

○福永 貴弘、藤田 翔貴、五味 勝也（東北大農）
○Takahiro FUKUNAGA, Shoki FUJITA, Katsuya GOMI (Tohoku Univ.)

麹菌 *Aspergillus oryzae* の細胞壁は、主に多糖によって構成され、グルカン、キチン、マンナンを主要な構成成分としており、少量のタンパク質および脂質を含む。細胞壁構成成分は菌類の物理的構造維持など重要な役割を果たしているにも関わらず、その生合成機構については断片的な情報があるのみで詳細は不明な部分が多い。そのうち、α-1,3-グルカン(AG)は主要な細胞壁構成成分の一つであり、AG は AG 合成酵素により生合成され、近年、α-1,3-グルカンが糸状菌の菌糸接着に寄与することが明らかになってきた。麹菌は染色体上に 3 種類の AG 合成酵素遺伝子 *agsA*, *agsB*, *agsC* が存在しているが、*agsB* 破壊株では AG の量が減少し、β-グルカンと キチンのファイバー形成を阻害する Congo red (CR) やキチンのポリマー形成を阻害する Calcofluor white (CFW)などの細胞壁ストレスを誘導する薬剤に高い感受性を示すことが報告されている[1)]。そこで本研究では、当研究室で保有する約 600 株の麹菌転写因子破壊株ライブラリーを使用したスクリーニングにより、*agsB* 破壊株と同様に CR や CFW に感受性を示す転写因子破壊株を探索することを目的とした。本発表では、そのスクリーニングによって同定された転写因子と、それらの転写因子破壊株における細胞壁構成成分の合成に関与する遺伝子群の発現解析の結果について報告する。

１）Zhang et al. J Biosci Bioeng. (2017) 124(1):47-53.

The cell wall of *Aspergillus oryzae* is mainly composed of polysaccharides such as glucan, chitin, and mannan, and contains small amounts of proteins and lipids. Although the cell wall components play an important role in maintaining the physical structure of the fungus, little information is available on their biosynthetic mechanisms. Among them, α-1,3-glucan (AG) is one of the major cell wall components and is biosynthesized by AG synthase (AGS). *A. oryzae* has three AGS genes (*agsA*, *agsB*, and *agsC*) on the chromosome. The *agsB*-disrupted strains contain little AG and are highly sensitive to agents that induce cell wall stress, such as Congo red (CR) and Calcofluor white (CFW). In the present study, we aimed to search for transcription factor disruptants that are susceptible to CR and CFW as was the *agsB* disruptant by screening a library of approximately 600 disruptants for transcription factor-related genes in our laboratory.

Aspergillus oryzae

講演番号：3A03-16
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:00～ ミーティングルーム A

糸状菌 *Aspergillus nidulans* におけるカーボンカタボライト抑制に関わる新奇転写因子

A novel transcription factor for carbon catabolite repression in *Aspergillus nidulans*

○國武 絵美[1]、柴山 智洋[2]、土谷 結衣[3]、花井 優大[4]、中村 真也[2]、木村 哲哉[1]、木村 真[2]、小林 哲夫[2] ([1]三重大院生資、[2]名大院生命農、[3]名大農、[4]三重大生資)
○ Emi KUNITAKE[1], Tomohiro SHIBAYAMA[2], Yui TSUCHIYA[3], Masahiro HANAI[4], Shinya NAKAMURA[2], Tetsuya KIMURA[1], Makoto KIMURA[2], Tetsuo KOBAYASHI[2] ([1]Grad. Sch. of Bioresources, Mie Univ., [2]Grad. Sch. of Bioagric. Sci. Nagoya Univ.,, [3]Nagoya Univ., [4]Mie Univ.)

糸状菌 *Aspergillus nidulans* におけるセルラーゼ遺伝子のカーボンカタボライト抑制 (CCR) は転写抑制因子 CreA とは独立して，cAMP 依存性プロテインキナーゼ (PKA, 本菌では PkaA) や三量体 G タンパク質の α サブユニット GanB を介した cAMP シグナル伝達経路を介して制御される。一方，前年度の本大会において，本菌のプロテアーゼ生産が GanB-PkaA 経路に正に制御されること，PkaA の標的と考えられる出芽酵母の転写抑制因子 Sfl1 の相同因子 SflA が負の制御に関与することを報告した。そこで本研究では SflA によるセルラーゼ遺伝子の CCR を検証することとした。プレートアッセイにより *sflA* 破壊株におけるグルコース存在下でのセルラーゼ生産性を解析した結果，野生株と同様に抑制されたままであった。プロテアーゼ生産に関する解析より，SflA は GanB-PkaA とは逆の機能を持つことが示されていたため，予想通りの結果である。*sflA*/*ganB* 二重破壊株でも抑制されたままであり，*ganB* 破壊株で見られた脱抑制が *sflA* の欠損によりサプレスされることが明らかとなった。これは転写解析においても同様の結果であった。以上より GanB-PkaA の下流で SflA が CCR を正に制御する因子の発現を抑制していると考えられる。SflA は DNA 結合ドメイン付近に Sfl1 と類似した PKA リン酸化部位を持つ。大腸菌で発現させた SflA を用いた解析により SflA の PKA によるリン酸化が確認された。現在 SflA の DNA 結合に関する解析を進めているところである。

Carbon catabolite repression (CCR) of the cellulase genes in *Aspergillus nidulans* is independently regulated by the transcriptional repressor CreA and cAMP signaling pathway factors such as PKA (PkaA) and Gα (GanB). In the 2020 Annual Meeting of JSBBA, we have reported that protease production in the fungus is positively regulated by the cAMP pathway and negatively by SflA, a homolog of *Saccharomyces cerevisiae* transcriptional repressor Sfl1, the activity of which is reported to be inhibited by PKA (Tpk2). In this study, we investigated whether SflA participate in CCR of the cellulase genes. In the presence of glucose, cellulase production on plate culture was repressed in Δ*sflA* as the wild type, however, the de-repressed cellulase production in Δ*ganB* was suppressed in Δ*sflA*Δ*ganB*; that is, CCR function, which is deficient in Δ*ganB*, was recovered in the double deletants. This was also confirmed by transcription analysis by RT-qPCR and RNA-seq. SflA has a possible PKA phosphorylation site (RRXS) near the DNA binding domain, and the recombinant SflA expressed in *E. coli* was phosphorylated by PKA. These results imply that SflA is the downstream target of the cAMP pathway in CCR, and suggest that it represses the expression of positive regulator of CCR.

carbon catabolite repression, Aspergillus, cellulase

講演番号：3A03-17
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:00～ ミーティングルーム A

C1 酵母 *Candida boidinii* におけるメタノール誘導性 mRNA の細胞内動態可視化解析

Visualization of intracellular dynamics of methanol-induced mRNAs in the methylotrophic yeast *Candida boidinii*

○赤木 美穂、幅田 亜香莉、由里本 博也、阪井 康能（京大院農）
○Miho AKAGI, Akari HABATA, Hiroya YURIMOTO, Yasuyoshi SAKAI (Kyoto Univ.)

C1 酵母 *Candida boidinii* をメタノール培地で培養すると、アルコールオキシダーゼ（AOD）やジヒドロキシアセトンシンターゼ（DAS）等のメタノール代謝に関わる酵素群とペルオキシソームが強力に誘導される。一方、細胞質内で形成される膜のない顆粒構造 Processing body（P-body）は、細胞質 mRNA の品質管理を担うことが知られており、メタノール誘導時に P-body が AOD や DAS の発現制御に関わることを明らかにしている [1)]。

本研究においては、メタノール誘導性 mRNA と P-body の細胞内局在を可視化により解析することを目的とした。U1A システムは、蛍光標識した U1A タンパク質と、目的 mRNA に U1A 結合部位を付加したものを共発現させ、mRNA を可視化する方法である。しかしこれまでの検討で U1A タンパク質が液胞に輸送され、細胞質における mRNA の可視化ができなかった。そこで今回、U1A タンパク質の液胞への輸送を回避するため、U1A システムを改良することにより、細胞質において mRNA を可視化することに成功した。現在、メタノール誘導性遺伝子の mRNA と P-body を同時に可視化する酵母株を作製し、メタノール誘導性遺伝子の発現制御における P-body の関与を調べている。

1) 幅田ら、日本農芸化学会 2019 年度大会講演要旨集 1C2a06

In the methylotrophic yeast *Candida boidinii*, enzymes responsible for methanol metabolism are highly expressed when cultured on methanol-containing medium. However, intracellular dynamics of mRNAs of these methanol-induced genes are poorly understood. Processing bodies (P-bodies), cytoplasmic membraneless granular structures, are known to be responsible for the quality control of cytoplasmic mRNAs. In this study, we aimed to visualize methanol-induced mRNAs to know their intracellular localization. After modification of U1A system, we successfully visualized methanol-induced mRNAs in cytoplasm. And we are now following intracellular localization of AOD- and DAS- mRNAs in relation to localization of P-bodies.

methylotrophic yeast, mRNA, *Candida boidinii*

講演番号：3A05-01
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 11:00～ ミーティングルーム A

エチレングリコールからのグリコール酸合成量向上を目指した高活性変異酵素スクリーニング系の構築

Establishment of a high-throughput screening system for mutant enzymes with improved activity to enhance a productivity of glycolic acid from ethylene glycol

○村主 渉[1]、山下 岳士[1]、山田 美和[2] ([1]岩手大院、[2]岩手大農)
○Wataru MURANUSHI[1], Takeshi YAMASHITA[1], Miwa YAMADA[2] ([1]Iwate Univ. Grad. Sch., [2]Iwate Univ.)

[目的] グリコール酸(GA)は、医薬品やポリマーの原料に広く利用される有機酸であり、様々な合成法が検討されている。我々は、大腸菌由来 lactaldehyde reductase(FucO)および lactaldehyde dehydrogenase(AldA)を用いた 2 段階の酵素反応による、エチレングリコールからの GA 合成に着目している。本研究では、当該反応による GA 合成量の向上を目指し、変異酵素ライブラリからの高活性変異酵素スクリーニング系の構築を目的とした。
[方法と結果] FucO、AldA 共発現プラスミドを導入した組換え大腸菌 BL21(DE3)株を、エチレングリコール(800 mM)および IPTG(0 mM、1 mM)含有 LB 培地(pH 8)において 24 時間液体培養し、培養液の GA 濃度を HPLC で分析した。その結果、0 mM、1 mM IPTG を添加した培地において、それぞれ 20.6 mM、37.4 mM の GA 合成が確認された。このとき、培養液の pH がそれぞれ pH 7.1、pH 4.6 に低下していたことから、GA 合成量の向上にともなって培養液の pH が低下することが示唆された。続いて、組換え大腸菌をエチレングリコール(800 mM)、IPTG(0 mM、1 mM)、および pH 指示薬(ブロモクレゾールパープル)含有 LB 寒天培地(pH 8.0)で培養した。その結果、IPTG 0 mM 寒天培地上のコロニーは、培養 48 時間ではほとんど変色しなかったが、IPTG 1 mM 寒天培地上のコロニーは、紫色から黄色へと経時的に変色した。よって、寒天培地上のコロニーの簡便なアッセイで、GA 合成量の高いクローンを検出できることが示唆された。最後に、Error-prone PCR によって FucO、AldA 遺伝子にランダム変異導入したプラスミドライブラリで大腸菌を形質転換し、IPTG 0 mM 寒天培地上におけるコロニーごとの変色を観察した。約 2,500 の変異体コロニーの変色を目視で観察し、この中から寒天培地上で黄色に変色した 59 コロニーをそれぞれ液体培養して、HPLC によって培養液の GA 濃度を測定した結果、57 コロニーで野生型と同等の GA 合成量が確認された。さらに、残りの 2 コロニーは野生型より GA 合成量が向上しており、本スクリーニング系が高活性変異酵素の取得に有効であることが示唆された。

Glycolic acid (GA) is an α-hydroxy acid which is extensively used in a variety of industries. In our previous study, we had produced GA from ethylene glycol, which is inexpensive raw material, using *Escherichia coli* over-expressing endogenous lactaldehyde reductase (FucO) and lactaldehyde dehydrogenase (AldA) genes. In order to increase the productivity of GA, we developed a high-throughput screening system for mutant enzymes with improved activity from a random mutant library.

Glycolic acid, Ethylene glycol, High-throughput screening

発表責任者：山田美和（myamada@iwate-u.ac.jp）

講演番号：3A05-02
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 11:00～ ミーティングルーム A

生分解性プラスチックナイロン 4 分解酵素の精製と諸性質解明
Purification and characterization of nylon4-degrading enzyme
○佐々浪 由梨香[1]、外村 彩香[2]、河合 盛進[3]、鈴木 宏昭[3]、山田 美和[1,4] ([1]岩手大・院総合科学、[2]熊本県大・共生環境、[3]トヨタ紡織・新領域開拓部、[4]岩手大・農)
○ Yurika SASANAMI[1], Ayaka HOKAMURA[2], Sung-Jin KAWAI[3], Hiroaki SUZUKI[3], Miwa YAMADA[1,4] ([1]Iwate Univ. Grad. Sch., [2]Pref. Univ. Kumamoto, [3]New Field Pioneering Div. Toyota Boshoku Co., [4]Iwate Univ.)

【目的】繰り返し構造内に 4 つの炭素原子を有するポリアミドのナイロン 4 は、バイオマス由来のグルタミン酸から得られる 2-ピロリドンをモノマーとするバイオベースポリマーであり、高い生分解性が認められている。また、高い融点・耐久性を持つなど物理的性質も優れているため、注目されている素材である。しかし、ナイロン 4 分解菌の報告はあるものの、これまでにナイロン 4 分解酵素の特定は達成されていなかった。そこで、本研究では、土壌中より単離したナイロン 4 分解菌である No.8 株が分泌するナイロン 4 分解酵素の精製法の構築と精製酵素の諸性質解析を目的とした。
【方法・結果】まず、No.8 株を 0.5%ナイロン 4 含有培地(pH 7.0)において、30℃ 条件下で培養した。培養液の上清を一日ごとに採取し、ナイロン 4 分解活性を測定することで分解酵素の産生量が最も高い培養日数を検討した。ナイロン 4 分解活性は、pH 7.5 の Tris-HCl バッファー条件下におけるナイロン 4 エマルションの分解を 600 nm の吸光度減少で測定し、1 時間当たりの吸光度減少値を 1 Unit として算出した。その結果、培養 3 日後の培養液上清におけるナイロン 4 分解活性が最も高く、分解酵素の分泌量が高いことが明らかとなった。そこで、本菌株を 3 日間培養した培養液上清 400 mL を用いて、ナイロン 4 分解酵素の精製を試みた。各種クロマトグラフィーの組み合わせを検討し、陰イオン交換クロマトグラフィー(DEAE-Toyopearl)とゲルろ過クロマトグラフィー(Toyopearl HW-55)を組み合わせることで、目的酵素を電気泳動上単一に精製することに成功した。得られた精製酵素の SDS-PAGE およびゲルろ過クロマトグラフィー分析によって、本酵素は約 90 kDa の単量体であることが示唆された。さらに、本酵素の最適 pH および最適温度は、それぞれ pH 7.5 と 35℃ であり、本酵素は 25-35℃ の反応条件下で 80%以上の活性を維持することが明らかとなった。一方で、本酵素の N 末端アミノ酸配列解析を試みたが決定できず、本酵素の N 末端がブロッキングされている可能性が示唆された。以上より、本研究では、ナイロン 4 分解活性を有する酵素を精製することに初めて成功し、その諸性質の一部を決定することができた。

We first succeed in purification of an enzyme which has degrading activity for nylon4, biobased and biodegradable plastic. Furthermore, we determined some enzymatic characteristics such as molecular mass, effect of pH and temperature on nylon4-degrading activity, N-terminal amino acid sequences, and so on.

Biodegradable plastic, Polyamide4, degradation enzyme

講演番号：3A05-03
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 11:00～ ミーティングルーム A

位置選択性の異なる二種類のエクオール水酸化酵素の機能解析

Characterization of two hydroxylases exhibiting differing regioselectivity for equol

○野澤 大樹[1]、向井 克之[2]、松山 彰収[2]、古屋 俊樹[1]([1]東京理科大院・理工、[2]（株）ダイセル)
○Daiki Nozawa[1], Katsuyuki Mukai[2], Akinobu Matsuyama[2], Toshiki Furuya[1] ([1]Fac. Sci. Tec., Tokyo Univ. Sci., [2]Daicel Corp.)

【背景・目的】大豆イソフラボンの腸内細菌による代謝物として得られるエクオールは、抗酸化作用やエストロゲン様作用などの有用な生理活性を有している。一方、ポリフェノール類の生理活性は水酸基の位置や数に大きく左右されるため、エクオールの水酸化体では生理活性の変化が予想され、その向上も期待できる。当研究室では、細菌由来フラビン依存性モノオキシゲナーゼ HpaB の二種類のホモログ酵素 $HpaB_{ro-3}$ および $HpaB_{pl-1}$ が、エクオールの 3′位および 6 位をそれぞれ位置選択的に水酸化することを発見した [1)]。しかし、これら HpaB ホモログ酵素の立体構造は未知であり、位置選択性の違いがどのような活性中心の構造に起因するのかは不明である。本研究では、当該 HpaB ホモログ酵素の立体構造をモデリングにより解析し、位置選択性の違いの原因を考察した。また、二種類の HpaB ホモログ酵素を組み合わせることにより、新規生理活性物質として期待されるジヒドロキシエクオールの合成を試みた。

【方法・結果】$HpaB_{ro-3}$ および $HpaB_{pl-1}$ の立体構造をモデリングにより構築し、得られた立体構造に対して(*S*)-エクオールを結合させたモデルを、AutoDock vina によるドッキングシミュレーションを複数回実施して構築した。その結果、活性中心に(*S*)-エクオールが結合したモデルがいくつか得られた。二種類のホモログ酵素のシミュレーション結果を比較したところ、保存された触媒部位のアミノ酸残基に対して(*S*)-エクオールが相互作用する方向に差異が見られた。一方、$HpaB_{ro-3}$ 発現大腸菌および $HpaB_{pl-1}$ 発現大腸菌を同時に添加して(*S*)-エクオールと反応させたところ、(*S*)-6,3′-ジヒドロキシエクオールへの変換が確認された（図 1）。フラスコスケールでの反応を検討したところ、24 時間で 2.4 g/L の(*S*)-6,3′-ジヒドロキシエクオールを合成できた。

1) T. Hashimoto, D. Nozawa, et al., RSC Adv., 9, 21826–21830 (2019).

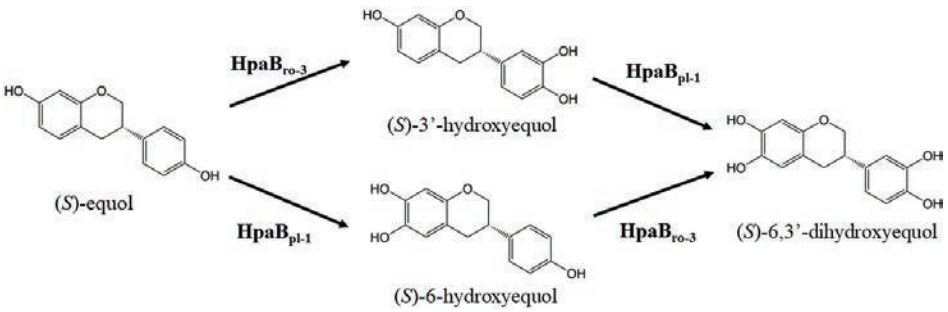


図 1 HpaB ホモログ酵素によるエクオールの水酸化

We recently discovered two monooxygenases catalyzing the synthesis of 3′- and 6-hydroxyequols, respectively, from equol. In this study, we achieved the synthesis of 6,3′-dihydroxyequol using the two enzymes.

equol, hydroxylation, monooxygenase

発表責任者：古屋俊樹（tfuruya@rs.tus.ac.jp）

講演番号：3A05-04
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 11:00～ ミーティングルーム A

組換え微生物による高性能バイオポリエステルの生合成

Biosynthesis of biopolyesters suitable for practical use by recombinant bacteria

○岡本 沙樹[1]、久永 理央[2]、西 愛美[2]、西上 明花[2]、後藤 早希[2]、河原 あい[1]、田中 賢二[3]、田口 精一[4]、松崎 弘美[1,2] ([1]熊本県大院・環境共生、[2]熊本県大・環境共生、[3]近畿大・産理工、[4]東農大・生命科学)
○Saki OKAMOTO[1], Rio HISANAGA[2], Aimi NISHI[2], Haruka NISHIGAMI[2], Saki GOTO[2], Ai KAWAHARA[1], Kenji TANAKA[3], Seiichi TAGUCHI[4], Hiromi MATSUSAKI[1,2] ([1]Grad. Sch. Environ. Sym. Sci., Pref. Univ. Kumamoto, [2]Fac. Environ. Sym. Sci., Pref. Univ. Kumamoto, [3]Fac. Humanity-Oriented Sci. Eng., Kindai Univ., [4]Fac. Life Sci., Tokyo Univ. Agric.)

【背景および目的】微生物が菌体内に合成・蓄積するポリヒドロキシアルカン酸（PHA）は、生分解性プラスチックとして期待されている。PHA は炭素数 4 の 3-ヒドロキシブタン酸（3HB）からなる P(3HB)ホモポリマーと炭素数 6～14 の 3-ヒドロキシアルカン酸（3HA）からなる P(3HA)コポリマーに大別される。しかし、野生株が合成する PHA は物性に難があり、実用的ではない。本研究では、組換え微生物を作製し、実用的な高性能バイオポリエステルを合成することを目的とした。
【方法および結果】*Pseudomonas* sp. 61-3 由来の低基質特異性 PHA 重合酵素あるいはその改変体遺伝子、および、乳酸（LA）ユニット供給系酵素遺伝子、3HB ユニット供給系酵素遺伝子、中鎖長 3HA ユニット供給系酵素遺伝子を導入した組換え微生物を作製した。糖を炭素源として培養を行った結果、組換え大腸菌において 3HB および中鎖長 3HA ユニット（C_8-C_{12}）からなる共重合ポリエステル P(3HB-*co*-3HA)および LA ユニットを含み、透明性を有する LA ベースポリマーを合成した。また、短鎖長特異的 PHA 重合酵素遺伝子を破壊した *Cupriavidus necator* H16dC の組換え株では、糖を炭素源として P(3HB-*co*-3HA)を合成した。現在は、P(3HB-*co*-3HA)のポリマー蓄積率の向上、および *C. necator* 組換え株による LA ベースポリマーの合成を進めている。

Polyhydroxyalkanoates (PHAs) accumulated in various bacteria, are expected as biodegradable plastics. The PHA-producing bacteria can be divided into two groups according to the monomeric units of the PHA, that is P(3HB) homopolymers consisting of 3-hydroxybutyrate (3HB) and P(3HA) copolymers consisting of medium chain length 3-hydroxyalkanoate (3HA). In general, the PHAs synthesized by wild strains have a problem with their mechanical and thermal properties. The aim of this study is to produce the recombinant bacteria that synthesize the biopolyesters suitable for practical use.

The recombinant bacteria into which the PHA synthase gene from *Pseudomonas* sp. 61-3 or the modified PHA synthase gene were introduced, in addition to the genes encoding the enzymes that supply lactic acid (LA), 3HB, and/or medium chain length 3HA units, were cultivated in the medium containing sugars as the sole carbon source. P(3HB-*co*-3HA) and LA-based polymers were synthesized in the recombinant *Escherichia coli* from glucose. In addition, P(3HB-*co*-3HA) was synthesized from fructose in the recombinant *Cupriavidus necator* H16dC in which the short chain length-specific PHA synthase gene was disrupted. The effective production of P(3HB-*co*-3HA) and the biosynthesis of LA-based polymers are now being performed by the recombinant strains of *C. necator*.

biodegradable plastics, polyhydroxyalkanoate, biopolyester

発表責任者：松崎弘美（matusaki@pu-kumamoto.ac.jp）

講演番号：3A05-05
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 11:00～ ミーティングルーム A

糸状菌 *Trichoderma asperellum* 由来糖質加水分解酵素の研究
Study on carbohydrate hydrolases from a filamentous fungus *Trichoderma asperellum*
○豊田 稜介[1]、劉 麗[1]、坂川 絵里香[1]、中村 華穂[2]、桑原 優樹[2]、鈴木 孝征[1,3]、金政 真[1,2]([1]中部大院・応生、[2]中部大・環生科、[3]中部大・応生化)
○Ryosuke TOYODA[1], Li LIU[1], Erika SAKAGAWA[1], Kaho NAKAMURA[2], Yuki KUWAHARA[2], Takamasa SUZUKI[1,3], Shin KANAMASA[1,2] ([1]Grad. Sch. Biosci. Biotech., Chubu Univ., [2]Dept. Envi. Biol., Chubu Univ., [3]Dept.Biol.Chem.Chubu Univ.)

バイオマスは地球上に最も多く存在する再生可能な資源であり、その利用過程で生じる二酸化炭素は植物に吸収されて炭素循環を形成することから、持続可能社会の実現に向けたひとつの解決策になると期待されている。食糧と競合しない木質バイオマスの利用のためには糖質加水分解酵素による分解（糖化）が必要である。しかし木質バイオマスはセルロースとヘミセルロース、リグニンからなる複雑で強固な構造のため、より効率的な分解方法の開発が課題である。愛知県の土壌から分離された糸状菌 *Trichoderma asperellum* IC-1 株は、代表的なセルラーゼ・ヘミセルラーゼ生産菌である *T. reesei* と同属のため高い酵素生産分泌能を有すると期待されるが知見はない。そこで本研究では、培養時の炭素源が本菌の糖分解酵素の生産性に与える影響を調べた。

本菌をフスマ、キシラン、キシロース、マンノース、アビセル、アラビノース、グルコースおよびペプトンなどを炭素源としたそれぞれの培地で培養し、カルボキシメチルセルラーゼ、キシラナーゼ、キシロシダーゼ、β－マンノシダーゼおよびキチナーゼの活性を測定したところ、それぞれの酵素の基質と関連する炭素源において生産誘導された。また、本菌をキシラン、アビセルおよびグルコースを炭素源としてそれぞれ液体培養した菌体から全 RNA を抽出した。我々が独自にゲノム解析して得た遺伝子情報を用いて RNA-Seq 解析し、得られた結果からセルラーゼ･ヘミセルラーゼ遺伝子の転写誘導に関する知見を得たことについても報告する。

Biomass is the most abundant renewable resource on the planet and is expected to realize a sustainable society. Enzymatic degradation is the first step for the use of cellulosic biomass. A filamentous fungus *Trichoderma asperellum* IC-1 isolated from soil is expected to have high glycoside hydrolases production and secretion ability. In this study, we investigated the effect of carbon sources, such as wheat bran, xylan, xylose, mannose, Avicel, arabinose and glucose, for culture on the productivity of enzymes of this fungus. This fungus was liquid-cultured using each medium containing xylan, Avicel and glucose as carbon source, and total RNA samples were extracted from the cells, and used for RNA-Seq analysis. We report that information on transcription induction of cellulase and hemicellulase genes was obtained by the analysis.

Trichoderma asperellum, cellulase, hemicellulase

発表責任者：金政　真（kanamasa@isc.chubu.ac.jp）

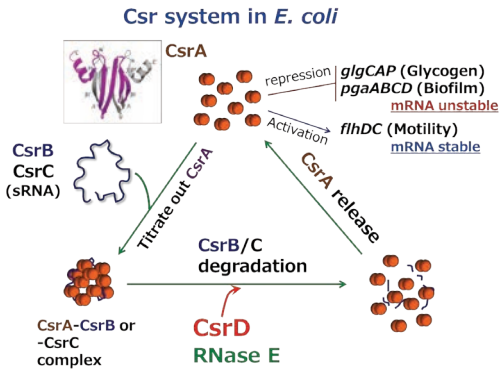
講演番号：3A05-06
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 11:00～ ミーティングルーム A

Csr システムにおける小分子 RNA 安定性制御因子 CsrD の解析

Analysis of CsrD, a stability regulator of small RNAs in Csr system

○吉田 将来[1]、山田 竣太[1]、石黒 志実[1]、岡村 龍盛[2]、杉本 華幸[1,2]、鈴木 一史[1,2]（[1]新潟大院・自然科学、[2]新潟大・農）
○Masaki YOSHIDA[1], Shunta YAMADA[1], Nozomi ISHIGURO[1], Ryusei OKAMURA[2], Hayuki SUGIMOTO[1,2], Kazushi SUZUKI[1,2] ([1]Grad. Sch. of Sci. and Tech., Niigata Univ., [2]Fac. of Agric., Niigata Univ.)

Csr（Carbon storage regulator）システムは、多くの真正細菌に存在する遺伝子発現調節機構であり、バイオフィルム形成やグリコーゲン合成、病原性などを制御する。*Escherichia coli* の Csr システムは、2 つのタンパク質と 2 つの small RNA からなる。CsrA は RNA 結合タンパク質であり、標的 mRNA と相互作用し、翻訳および mRNA 安定性を変化させることで様々な遺伝子発現を制御する。Small RNA である CsrB と CsrC は、複数の CsrA 結合部位を含む多くのステムループ構造からなり、標的 mRNA から CsrA を隔離する。CsrD は CsrB/C RNA の RNase E 依存性分解を調節し、それにより細胞内の CsrA 活性を制御する。



今回、CsrD ホモログ間で保存性の高いアミノ酸残基をアラニンに置換し、*E. coli* で発現させて CsrD 活性を調べた。その結果、CsrD 活性に影響を与えると考えられるアミノ酸残基が特定された。さらに、魚類病原細菌である *Aeromonas salmonicida* で同定された CsrD においても、それらのアミノ酸残基がほぼ保存されており、*A. salmonicida* CsrD を *E. coli csrD* 変異体で過剰発現させた際、その表現型を補完した。

The Csr (Carbon storage regulator) system coordinates the expression of various genes in many eubacteria and regulates biofilm formation, glycogen synthesis and virulence. In *Escherichia coli*, the Csr system comprises two proteins and two small RNAs. CsrA regulates translation by binding to target mRNA. Small RNAs, CsrB and CsrC, are composed of many stem-loop structures, and CsrA binding sequences are on the multiple loop regions of them, thereby suppressing the function of CsrA. The other protein, CsrD, regulates the RNase E dependent degradation of CsrB/C RNAs.

In this study, we replaced well-conserved amino acid residues of CsrD in its homolog with alanine residues and expressed the CsrD mutants in *E. coli*. As a result, the residues affecting CsrD activity were determined. These residues were also highly conserved in CsrD of *Aeromonas salmonicida*, a bacterial fish pathogen. Overexpression of *A. salmonicida* CsrD complemented the phenotype of *E. coli csrD* mutant.

Csr system, CsrD, small RNA

発表責任者：鈴木 一史（ksuzuki@agr.niigata-u.ac.jp）

講演番号：3A05-07
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 11:00～ ミーティングルーム A

Saccharomyces cerevisiae と *Saccharomyces eubayanus* からなる disomy の解析
Analysis of disomy consisting of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces eubayanus*

○山下 敦士[1,2]、高橋 朋子[1,2,3]、加藤 拓[3]、只見 秀代[3]、永富 康司[3]、岩間 亮[1,2]、福田 良一[1,2]、堀内 裕之[1,2]、野田 陽一[1,2] ([1]東大院・農生科、[2]東大・微生物連携機構、[3]アサヒクオリティーアンドイノベーションズ（株）醸造科学研究所)
○Atsushi YAMASHITA[1,2], Tomoko TAKAHASHI[1,2,3], Taku KATO[3], Hideyo TADAMI[3], Yasushi NAGATOMI[3], Ryo IWAMA[1,2], Ryouichi FUKUDA[1,2], Hiroyuki HORIUCHI[1,2], Yoichi NODA[1,2] ([1]Grad. Sch. Agri. and Life Sci., UTokyo., [2]CRIIM, Dept. of Biotech., UTokyo., [3]Brewing Science Laboratories, Asahi Quality & Innovations, Ltd.)

（背景・目的）ラガービールの醸造に用いられる下面発酵酵母 *Saccharomyces pastorianus* は、*S. cerevisiae* と *S. eubayanus* から形成されたハイブリットがその起源とされており，それぞれの親株の性質を引き継いだと考えられる複雑な性質を持っている。*S. pastorianus* は正常な核型を維持していない異数体（aneuploid）であり，そのゲノムは不安定である．本研究では，異種由来の染色体，遺伝子産物がどのように影響し合って、現在の *S. pastorianus* の持つ染色体構造に至ったか，そのゲノムの不安定性の理由，異種由来の遺伝子異産物が *S. pastorianus* においてどのように機能しているかを明らかにすることを目的とする．

（方法・結果）我々はまず *S. eubayanus* の染色体の導入が *S. cerevisiae* にどのような影響を与えるかを解析した。具体的な方法としては、*kar1*Δ*15* 変異による核融合の不全を利用した染色体の移行法[1]を用いて，*S. eubayanus* が持つ 16 本の染色体を順次一倍体の *S. cerevisiae* に移行した disomy の作製を試みた。現在順次移行の途中であるが，この disomy の作成の途中で得られた複数の *S. eubayanus* の染色体を持った *S. cerevisiae* は、顕著な細胞形態異常と、生育不全を示すことを見出した。この結果から、異種の染色体を持つことにより、細胞形態形成の過程に異常を生じ，生育に支障が生じることが示唆された．本発表では，これらの異種酵母からなる異数体と disomy の性質をより包括的に報告する．また disomy の作製時に *S. cerevisiae* の細胞に移行する *S. eubayanus* のミトコンドリアの挙動，細胞の性質への影響に関しても報告する予定である．

(Introduction) The bottom-fermenting yeast *Saccharomyces pastorianus*, used for brewing lager beer, is thought to have originated from a hybrid formed from *S. cerevisiae* and *S. eubayanus*. *S. pastorianus* is an aneuploid that does not maintain a normal karyotype and its genome is unstable. The purpose of this study is to understand how heterologous chromosomes interact with each other to form the current chromosome structure of *S. pastorianus*.(Methods and Results) We analyzed how the induction of chromosomes from *S. eubayanus* affects *S. cerevisiae*, and we attempted to create a disomy by sequentially transferring 16 chromosomes from *S. eubayanus* to a haploid *S. cerevisiae* [1]. We found that disomic strains show morphological abnormalities and growth defects in the process of making these strains.

[1] Torres et al., Science, 317, 916-924(2007)

yeast, hybrid, chromosome

講演番号：3A05-08
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 11:00～ ミーティングルーム A

サナギタケ（*Cordyceps militaris*）由来レクチン遺伝子群の遺伝子クローニングおよび異種発現系の構築

cDNA cloning and construction of heterologous expression system of lectin from the mushroom, *Cordyceps militaris*.

○佐藤 千裕[1]、依田 彬義[1,2]、小野 晶子[1,2]、鈴木 稔之[1]、田中 裕紀[2,3]、金野 尚武[2,3]、野村 崇人[1,2]、鈴木 智大[1,2] ([1]宇都宮大・バイオ、[2]宇都宮大・農、[3]東京農工大・連合農学)
○ Chihiro SATO[1], Akiyoshi YODA[1,2], Akiko ONO[1,2], Toshiyuki SUZUKI[1], YUKI TANAKA[2,3], Naotake KONNO[2,3], Takahito NOMURA[1,2], Tomohiro SUZUKI[1,2] ([1]C-Bio, Utsunomiya Univ., [2]Sch. of Agric., Utsunomiya Univ., [3]TUAT)

サナギタケ（*Cordyceps militaris*）は、バッカクキン科（Clavicipitaceae）に属するキノコの一種であり、古くから漢方薬などに利用されてきた。本研究室ではこれまでに、サナギタケ由来レクチン（*Cordyceps militaris* lectin、CmLec）の 1 つである CmLec4 が、宿主であるカイコ蛹の羽化および子実体形成に影響を及ぼすことを見出している [1)]。そこで、本研究ではサナギタケのゲノム情報からレクチン遺伝子群をマイニングし、遺伝子クローニング・異種発現系の構築を行うことを目的とした。

サナギタケのドラフトゲノム情報から Pfam 検索を用いて既知のレクチンドメインを有する遺伝子を探索し、8 つの遺伝子を選抜した。さらに各演繹アミノ酸配列を、MAFFT を用いてアライメントし neighbor-joining 法で系統樹を作成したほか、SignalP および TMHMM を用いてシグナルペプチドおよび膜貫通領域の有無を推定した。その結果、3 つのレクチン遺伝子がシグナルペプチドを有することが明らかとなり、2 つは膜内在性の Legume 型レクチン、1 つは分泌性の Ricin 型レクチンと推定された。次いで、上記レクチン遺伝子群の遺伝子クローニングを行った結果、2 つの膜内在型遺伝子についてはイントロンが切り出されず偽遺伝子化されていることが示唆された。そこで分泌型の Ricin 型レクチン（CmRLec と命名）について、大腸菌および酵母（*Pichia pastoris* および *Kluyveromyces lactis*）を用いた異種発現系の構築を試みている。

The mushroom *Cordyceps militaris*, which parasites mainly on insects and other arthropods, has been used for a long time as traditional Chinese medicines. In our previous study, we have been reported that one of the *C. militaris* lectin (CmLec4) affects the emergence of the host (Silkworm pupa) and fruiting body formation. Thus, the purpose of this study is to mine the lectin gene(s) from the genomic information of this mushroom, and to perform cDNA cloning and construction of a heterologous expression system.

As a result, we mined total eight genes for lectin based on the gene annotations. One of them, named *cmrlec* gene, was selected for further study as it was identified as novel ricin-type secretory lectin from the results of some bioinformatics analysis and cDNA cloning. We are now trying to construct the heterologous expression system for recombinant CmRLec using *Escherichia coli*, *Pichia pastoris*, and *Kluyveromyces lactis*.

1) 小野ら、冬虫夏草（*Cordyceps militaris*）由来レクチンの機能解析、日本農芸化学会 2019 年度大会

mushroom forming fungi, lectin, fungi

発表責任者：鈴木智大（suzukit@cc.utsunomiya-u.ac.jp）

講演番号：3A05-09
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 11:00～ ミーティングルーム A

冬虫夏草サナギタケ（*Cordysceps millitaris*）の交配型遺伝子の機能解析

Functional analysis of mating-type specific genes of *Cordyceps militaris*.

○鈴木 稔之[1]、小野 晶子[1]、鈴木 貴也[2]、崔 宰熏[3,4]、河岸 洋和[3,4]、道羅 英夫[2,4]、鈴木 智大[1] ([1]宇都宮大・バイオ、[2]静岡大・理、[3]静岡大・農、[4]静岡大・グリーン研)
○ Toshiyuki SUZUKI[1], Akiko ONO[1], Takaya SUZUKI[2], Jae-Hoon CHOI[3,4], Hirokazu KAWAGISHI[3,4], Hideo DOHRA[2,4], Tomohiro SUZUKI[1] ([1]C-Bio, Utsunomiya Univ., [2]Dept. of Sci., Grad. Sch. of Integr. Sci. and Technol., Shizuoka Univ., [3]Dept. of Agr., Grad. Sch. of Integr. Sci. and Technol., Shizuoka Univ., [4]Res. Inst. of Green Sci. and Technol., Shizuoka Univ.)

Cordyceps 属の真菌は約 500 種存在し、主に昆虫やその他の節足動物に寄生する。その一種であるサナギタケ（*Cordyceps militaris*）はチョウ目の幼虫やサナギに寄生する冬虫夏草の一種であり、世界中に分布している。また、このキノコは幅広い薬理活性を示すと報告されているため、ゲノム・トランスクリプトーム解析など様々な手法を用いて解析されている。また一般的に、真菌の生活環には無性世代（anamorph）と有性世代（teleomorph）の 2 つの世代サイクルからなり、真菌の有性生殖は単一の調節交配型遺伝子座（サナギタケにおいては MAT と呼ばれる）によって制御される。

本研究室でこれまでに行ったサナギタケのゲノム解析から、本菌の MAT-α 遺伝子座には 2 種類の交配遺伝子（*MAT1-1-1* および *MAT1-1-2*）が存在し、MAT-HMG 遺伝子座には 1 つの交配型遺伝子(*MAT1-2-1*)が存在することを確認している。本研究ではこれら全ての交配型遺伝子の機能を検討するため、アグロバクテリウムを用いたサナギタケの MAT 遺伝子の破壊株の作出とその機能解析を行った。

The genus *Cordyceps* parasite mainly on insects and other arthropods, and include about 500 species. One of them, the fruiting body-forming fungus, *Cordyceps militaris*, parasitizes larva or pupa of lepidoptern insects, and distributes worldwide. This fruiting body has been reported to contain bioactive compounds showing a wide range of pharmacological activities, such as anti-angiogenesis, anti-tumor, anti-inflammatory, anti-oxidant, anti-fatigue, and anti-diabetic activities. Because of its beneficial values, *C. militaris* has been studied in a variety of ways such as genomic sequencing, transcriptomic, proteomic expression analysis. In general, fungi use reproductive strategies including two generation cycles, asexual generation (anamorph) and sexual generation (teleomorph). Sexual reproduction in fungi is controlled by a single regulatory mating-type locus (MAT).

It has been reported that there are two mating genes in MAT-α locus (*MAT1-1-1* and *MAT1-1-2*) and one mating type gene in MAT-HMG locus (*MAT1-2-1*) in the *C. militaris* genome. In this study, we constructed knockout strains of these mating-type genes to investigate the functions of all mating-type genes.

mushroom-forming fungi, *Cordyceps militaris*, mating type gene

発表責任者：鈴木　智大（suzukit@cc.utsunomiya-u.ac.jp）

講演番号：3A05-10
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 11:00～ ミーティングルーム A

DNA 損傷依存的な姉妹染色分体間接着への核膜孔の関与
Relocation of DNA breaks to nuclear pores is involved in damage-induced sister chromatid cohesion

○堀籠 智洋[1]、折原 行希[1]、高橋 大輔[1]、小西 辰紀[1]、尾間 由佳子[1]、島田 健士[2]、ガッサー スーザン[2]、原田 昌彦[1] ([1]東北大農、[2]フリードリッヒ・ミーシャー生物医学研究所)
○Chihiro HORIGOME[1], Yuki ORIHARA[1], Daisuke TAKAHASHI[1], Tatsunori KONISHI[1], Yukako OMA[1], Kenji SHIMADA[2], Susan M. GASSER[2], Masahiko HARATA[1] ([1]Tohoku Univ., [2]Friedrich-Miescher Institute for Biomedical Research)

DNA 二本鎖切断（DSB）は、ゲノムの不安定化や細胞のがん化、細胞死にいたる可能性を持つ重篤な損傷である。近年の出芽酵母を用いた研究により、持続的にひき起こされる DSB は核膜へと移動して核膜孔複合体および核内膜タンパク質 Mps3 と結合し、異常な組み換えが抑制されることが明らかとなった。また、DSB に結合する修復タンパク質の多くは SUMO 化修飾を受けるが、我々は SUMO 化酵素 Siz2 および Mms21 によるタンパク質のポリ SUMO 化修飾が DSB の核膜孔結合に必要であることを報告している。

本研究では、核膜孔において異常な組み換えが抑制される機構の解明を目指した。DSB が引き起こされると近傍にコヒーシン構成因子 Scc1 が結合し、Mms21 による Scc1 の SUMO 化を介して姉妹染色分体間接着（コヒージョン）が形成されることが知られている。我々は、DSB が核膜孔に結合できない変異株において、損傷部位のコヒージョン形成に欠陥がみられることを見出した。この変異株では Scc1 の SUMO 化が減少していたが、人為的に Mms21 を DSB 近傍に結合させると DSB 依存的なコヒージョンが回復した。これらのことから、DSB が核膜孔に移動して結合することにより Mms21 依存的な Scc1 の SUMO 化修飾が行われ、DSB 領域のコヒージョン形成と正確な修復が促進されることが示唆された。

In budding yeast, persistent DNA double-strand breaks (DSBs) are recruited to the nuclear periphery and associate with nuclear pores or with an inner nuclear membrane SUN domain protein called Mps3. Mps3 appears to sequester resected DSBs and thereby inhibits aberrant recombination events, whereas nuclear pores are implicated in the non-canonical repair pathways such as BIR and imprecise end-joining. Nonetheless, the precise mechanisms by which DSBs are repaired at the nuclear periphery are poorly understood.

We show here that relocation of DNA breaks to nuclear pores, but not to Mps3, is involved in damage-induced sister chromatid cohesion. DSB relocation to nuclear pores facilitates the SUMOylation of Scc1 and the ectopic targeting of SUMO E3 ligase Mms21 to the DSB site is sufficient for the cohesion establishment at the DSB locus. These observations provide novel knowledge concerning molecular mechanisms with which the DSB relocation to nuclear pores contributes to the maintenance of genome stability.

nuclear envelope, sister chromatid cohesion, DNA double-strand break

発表責任者：堀籠智洋（chihiro.horigome.b7@tohoku.ac.jp）

講演番号：3A05-11
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 11:00～ ミーティングルーム A

ビフィズス菌によるスクロースアナログ二糖の資化に関する研究

Assimilation of sucrose analog disaccharides by bifidobacterial.

○保坂 浩貴、中村 啓喜、平野 貴子、袴田 航、西尾 俊幸（日大院生資科）
○Hiroki HOSAKA, Hiroki NAKAMURA, Takako HIRANO, Wataru HAKAMATA, Toshiyuki NISHIO (Graduate School of Bioresource Sciences, Nihon Univ.)

当研究室ではスクロサミン(SucN)、*N*-アセチルスクロサミン(SucNAc)、スクロン酸(SucA)、およびスクロン酸アミド(SucAm)といったスクロース(Suc)構造を有するヘテロオリゴ糖である Suc アナログ二糖の合成に成功している。現在、それら Suc アナログ二糖のプレバイオティクス機能の評価を行なっており、ビフィズス菌の増殖と分解酵素との関係について調査している。本発表では、これまでに得られた結果について報告する。

Suc アナログ二糖に対する資化性試験を行ったところ、各二糖に対する資化性はスクロースと比較して低かった。しかし、*Bifidobacterium pseudocatenulatum* は SucNAc で特異的に増殖することが確認できた。また、*Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* では、全てのスクロースアナログ二糖を良く資化できることが確認できた。このことから、Suc アナログ二糖の資化性は種によって異なることが示唆された。また、生物がオリゴ糖を代謝して栄養源にするためには、それを単糖に分解する必要がある。そこで、Suc アナログ二糖により増殖したビフィズス菌の細胞内グリコシダーゼに関して調査した。

各オリゴ糖で培養後、乾燥菌体を作製し、各オリゴ糖に作用させたところ、Suc で培養した *B. pseudocatenulatum* では Suc の分解が確認できたが、Suc アナログ二糖の分解は確認できなかった。しかし、*B. infantis* では用いた全ての二糖の分解が確認できた。このことから、Suc アナログ二糖の分解に関わる酵素の生産は種によって異なることが示唆された。次に、*B. pseudocatenulatum* に注目し酵素の精製を行ったところ、Suc 添加培養時にはスクロースホスホリラーゼが、SucNAc 添加培養時には β-フルクトフラノシダーゼが生産されることが確認できた。このことから、添加するオリゴ糖によって生産される酵素が異なることが示唆された。

In this study, we investigated the effects of 4 kinds of sucrose (Suc) analog disaccharides on the growth of 8 species of bifidobacteria and 3 species of lactobacilli isolated from the human intestine. We confirmed that all bacterial strains could utilize Suc as a nutrient source for growth; in contrast, only specific species of bifidobacteria showed growth with Suc analog disaccharides. When oligosaccharides are utilized as a nutrient source by bacteria, they are often broken down into monosaccharides or their derivatives by cellular enzymes before entering the intracellular glycolytic pathway. Therefore, to clarify the above phenomenon involved in the growth of bifidobacteria using Suc analog disaccharides, we investigated the cellular glycosidases of 3 strains of bifidobacteria shown to be capable or incapable of growth in the presence of these disaccharides. As a result, it was confirmed that the strains capable of growth using Suc analog disaccharides show greater productivity of glycosidases that degrade these disaccharides than strains not capable of growth. When we investigated Suc analog disaccharides hydrolyzing glycosidase produced by *B. pseudocatenulatum*.

Bifidobacterial, Sucrose analog disaccharides, Glycoside hydrolase

発表責任者：西尾俊幸（nishio.toshiyuki@nihon-u.ac.jp）

講演番号：3A05-12
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 11:00～ ミーティングルーム A

スクロースアナログ二糖によるヒト腸内由来細菌の増殖特性

Growth of human intestinal bacteria by sucrose analog disaccharides

○中村 啓喜[1]、保坂 浩貴[1]、栗栖 由佳[2]、平野 貴子[1,2]、袴田 航[1,2]、西尾 俊幸[1,2] ([1]日大院生資科、[2]日大生資科)
○Hiroki Nakamura[1], Hiroki Hosaka[1], Yuka Kurisu[2], Takako Hirano[1,2], Wataru Hakamata[1,2], Toshiyuki Nishio[1,2] ([1]Graduate School of Bioresource Sciences, Nihon Univ., [2]College of Bioresource Sciences. Nihon Univ.)

【目的】当研究室ではスクロース(Suc)のグルコース残基が様々な糖に置き換わった Suc 類似構造を有するオリゴ糖の合成とそれらプレバイオティクス機能の評価を行なっている。これまでの成果として、Suc のグルコース残基がグルコサミン、*N*-アセチルグルコサミン、グルクロン酸、およびグルクロン酸アミドに置き換わったスクロサミン(SucN)、*N*-アセチルスクロサミン(SucNAc)、スクロン酸(SucA)、およびスクロン酸アミド(SucAm)の合成に成功した。これら Suc アナログ二糖のヒト腸内由来善玉菌に対する増殖効果を評価した結果、特定の種のビフィズス菌株を特異的に増殖させることが確認できた。しかし、ヒト腸内細菌には善玉菌以外に日和見菌や悪玉菌など多種多様な属種の細菌が存在している。よって、これら Suc アナログ二糖が腸内細菌に与える影響を評価するためには、善玉菌以外の細菌に対する資化性試験を行う必要がある。また、*Clostridium* 属や *Bacteroides* 属の一部の日和見菌は、次世代型プレバイオティクスとして期待されている。そこで本研究では、多種多様なヒト腸内由来細菌の各種 Suc アナログ二糖による増殖効果を調査した。
【方法・結果】ヒト腸内より単離された 78 株の細菌（RD 株）を用いて実験を行なった。それらのうち、実験で用いる GAM 寒天培地と MRS 液体培地において生育が良好であった菌株については、各種 Suc アナログ二糖による資化性試験を行なった。GAM 寒天培地上のコロニーを各種 Suc アナログ二糖の終濃度が 30 mM になるように調節した MRS 液体培地に添加し、各時間における菌の増殖を確認した。菌体の増殖はマルチプレートリーダーを用いて OD_{655} における培養液の濁度を測定し評価した。その結果、ビフィズス菌だけではなく *Bacteroides* 属の一部菌株が各種 Suc アナログ二糖によって特異的に増殖することを確認した。本発表では、これまでに得られた結果について報告する。

We synthesized sucrose analog disaccharides (sucrosamine, *N*-acetylsucrosamine, sucronic acid, and sucronamide) in which D-glucose residue of sucrose was replaced with glucosamine, *N*-acetylglucosamine, glucuronic acid, or glucuronamide. These oligosaccharides grew specific species of bifidobacteria such as *Bifidobacterium infantis*, an enterobacterium expected as probiotics. However, bacteria of various genera inhabit in the human intestine. In addition, certain species of bacteria belonging to the genus clostridium or bacteroides are expected to become next-generation probiotics. Therefore, in this study, we investigated the growth effects of various sucrose analogs disaccharides on a wide variety of human enterobacteria, especially opportunistic bacteria. In this presentation, we will report the results obtained so far.

human intestinal bacteria, sucrose analog disaccharides, bacterial growth

講演番号：3A05-13
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 11:00～ ミーティングルーム A

D-システインの抗菌力評価と抗菌力要因の検討

Investigation of antimicrobial activity and action of D-Cysteine

○内田 脩斗[1]、松村 吉信[1,2]([1]関西大・生命生物工、[2]関西大・ORDIST)
○Shuto UCHIDA[1], Yoshinobu MATSUMURA[1,2] ([1]Dept. Life science and biotechnology, Kansai Univ., [2]ORDIST, Kansai Univ.)

【背景】D-アミノ酸は、L-アミノ酸の光学異性体であり、バクテリアでは D-Ala が細胞壁成分として利用されている。D-アミノ酸の抗菌性に着目すると、ヒト腸管上皮細胞の D-アミノ酸酸化酵素が D-アミノ酸を分解する際に生じる過酸化水素が *Vibrio* 属細菌に強い抗菌活性を示すことが報告されている。さらに一部の微生物においても D-アミノ酸酸化酵素を持つことが知られ、D-アミノ酸単独でのバクテリアに対する抗菌性を持つことが予想される。そのため本研究では D-アミノ酸の抗菌性評価、増殖への影響とともに生理活性機能について調査した。
【方法】複数の試供菌株を用いて D-アミノ酸および一部の L-アミノ酸の最小発育阻止濃度(MIC)測定法で抗菌性評価を行い、バクテリア細胞の増殖は A_{660} で測定した。バクテリア細胞の生死判定には蛍光色素である SYTO9 と PI による蛍光顕微鏡観察を用いた。培地には酵母エキスを加えた BSM 改変無機塩培地に最大 20mM D-アミノ酸を添加したものを使用した。培養条件は 37℃で 120 rpm、24 時間とした。
【結果】抗菌性評価を行なった D-アミノ酸の中で、D-システイン添加時において *E. coli* OW6 を含めた複数の菌株で明らかな増殖の抑制が見られた。D-システイン以外の D-アミノ酸では顕著な増殖抑制は見られず、同濃度の L-システイン添加時でも増殖抑制は見られなかった。D-システイン添加による増殖抑制がバクテリア細胞内の L-アミノ酸代謝系に起因すると予想されたことから、L-アミノ酸と D-Cys を併用して培養を行った。20 mM L-Gln を添加した場合で 24 時間培養後の細胞密度が一部改善されたが、増殖速度に大きな変化は現れなかった。L-アミノ酸併用時でも限定的な増殖抑制の解除であったために D-システイン添加に部分的な細胞死滅作用が予想されたため、D-Cys 添加後のバクテリア細胞の生死判定を行ったが、D-Cys 添加による顕著な細胞死滅は認められなかった。

D-amino acids are optical isomers of L-amino acids and some of them are also present in bacteria. We investigated antimicrobial activity and properties of D-amino acids. As the results, D-Cys is remarkably inhibited bacterial growth among using D-amino acids investigated. On the other hands, its effects are partially recovered in addition of some L-amino acids. In addition, It was not confirmed that D-Cysteine possessed an obvious bactericidal action by the using fluorescence microscope method.

D-amino acids, microbial control, growth rate

発表責任者：松村　吉信（ymatsu@kansai-u.ac.jp）

講演番号：3A05-14
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 11:00～ ミーティングルーム A

ブタの糞から単離された *Parabacteroides distasonis* のコハク酸産生条件
Succinate production by *Parabacteroides distasonis* isolated from pig feces
○佐藤 茉由[1]、宮本 浩邦[1,2,3]、児玉 浩明[1] ([1]千葉大院・園芸、[2]サーマス、[3]理研・IMS)
○Mayu SATO[1], Hirokuni MIYAMOTO[1,2,3], Hiroaki KODAMA[1] ([1]Grad. Sch. Horticul., Chiba Univ., [2]Sermas, [3]IMS,RIKEN)

【目的】好熱菌を利用し、未利用の海産資源を高温・好気条件下で発酵させた飼料（以下、好熱菌発酵産物）や、好熱菌発酵産物から単離されたプロバイオティクスである *Bacillus hisashii* をブタに給与した際、死産率の低下や成長促進、過剰な脂肪蓄積の軽減などの生理作用が見られる。またこのとき糞中のコハク酸や乳酸含量が減少する傾向にある一方で、コハク酸産生菌として知られる Bacteroidetes 門細菌が増加することが観察されている。*B. hisashii* を給与したブタの糞から単離された *Parabacteroides distasonis* は培地条件によってコハク酸や乳酸の代謝が変化する。*P. distasonis* によるコハク酸産生は肥満改善に重要とする報告があるため、本研究では、培地成分を改変した際の *P. distasonis* の有機酸産生を調べ、コハク酸産生条件を明らかにすることを目的とした。
【方法･結果】糞から単離した *P. distasonis* を一般嫌気性菌培養培地である GAM 培地で液体培養し、HPLC を用いた有機酸分析を行ったところ、主にコハク酸を産生し培地中の乳酸が減少することが確認された。この結果を受け GAM 培地に乳酸を添加したところ、乳酸を資化することが明らかとなった。一方で、糖源を変更して液体培養実験を行うために EG 培地を作成し糖源を変更して液体培養を行った結果、GAM 培地にも添加されている溶性でんぷんを糖源として用いた場合でもコハク酸はあまり産生されず、主に酢酸、プロピオン酸が産生されること、GAM 培地では資化されていた乳酸が EG 培地では逆に産生されることが明らかとなった。EG 培地と GAM 培地の組成の違いに着目し、コハク酸や乳酸の資化、産生能に影響する培地成分の検討を行った。

Thermophile-fermented compost and *Bacillus hisashii* isolated from the compost confer health benefits in pigs. When pigs are orally administered with *B. hisashii*, fecal Bacteroidetes population was increased, and fecal succinate level was decreased. In our previous study, we isolated a strain of *Parabacteroides distasonis* from pig feces and showed that this bacterium produced succinate in the GAM medium, but not in the EG medium. Since succinate production by *P. distasonis* is expected to be important for alleviation of obesity, we tried to identify which component of the GAM medium control the succinate production by *P. distasonis*.

Bacteroidetes, succinate, metabolism

講演番号：3A05-15
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 11:00～ ミーティングルーム A

緑膿菌バイオフィルム形成を抑制または促進する物質の探索

Isolation and characterization of inhibitors or enhancers to biofilm development from microorganism metabolites.

○俣木 歩実[1]、松村 吉信[2]([1]関西大・生命生物工、[2]関西大・ORDIST)
○Ayumi MATAKI[1], Yoshinobu MATSUMURA[2] ([1]Dept. Life Science & Biotechnol, Kansai Univ., [2]ORDIST, Kansai Univ.)

【背景】バイオフィルム（BF）は、多種多様な細菌が高密度で生息する集団である。BF は固体表面への強力な付着や、薬剤耐性の上昇といった個々の細菌の単なる足し算を超えた特徴を示し、殺菌・除去が困難となっている。BF 形成過程を観察すると、物体への付着や BF の脱離に関与する細胞の運動性やバイオサーファクタント生産等が細胞の機能として重要であると報告されている。これまで、当研究室で自然環境から単離・保存している様々な微生物を用いて、単一菌株培養系および二菌株混合培養系で形成する BF 形成能を比較し、BF 形成を抑制または促進する組み合わせを探索した。その結果、*Pseudomonas aeruginosa* PA01 株の BF 形成を促進および抑制する培養液として、それぞれ、*Bacillus sp.* B24 株および *Bacillus sp.* A13 株の培養上清が確認された。本研究では、A13 株および B24 株の BF 形成の促進および抑制に関わる要因物質の探索を行った。
【方法】BF 形成菌株とし、*P. aeruginosa* PA01 株、BF 形成に栄養を及ぼす菌株として A13 株、B24 株を用いた。BF はポリスチレン製マイクロプレートで TSB 培地、37℃で形成させた。BF 定量はクリスタルバイオレット（CV）染色法を用いて A_{570} で評価した。運動性測定には 0.3%～1.0%寒天 TSB 培地を用いて 30℃、2 日間静置培養した。
【結果】各菌株の培養時間における要因物質の生産量を調査するために、1～24 時間培養した A13 株および B24 株培養液上清を PA01 培養液に添加し、BF 形成増加率を比較した。その結果、A13 株は 12 時間培養上清において BF 形成抑制、B24 株は 2 時間培養において BF 形成促進に最も作用した。また、A13 株および B24 株培養上清中の BF 形成抑制・促進物質の耐熱性試験を行った結果、A13 株、B24 株ともに加熱の有無による BF 形成量の変化はなかった。このことから、要因物質は耐熱性を示す比較的低分子物質であると考えられる。さらに、A13、B24 株培養上清を添加した PA01 株細胞の運動性（Swimming、Swarming、Twitching）の変化を調査した結果、A13 株および B24 株で 0.5%寒天培地において運動性の向上が確認された。このことから Swarming に関与する鞭毛やバイオサーファクタント生産量が変化した可能性が高い。今後、要因物質の単離とそれらの作用特定を行う予定である。

Biofilm (BF) are populations of a wide variety of bacteria. In the previous study, the supernatants of the cultures of *Bacillus* sp. strains B 24 and A 13 were identified as the culture medium that promoted and inhibited BF formation of Pseudomonas aeruginosa PA01, respectively. Strain A 13 inhibited BF formation in 12 h culture supernatant, and strain B 24 stimulated BF formation in 2 h culture. These factors showed heat resistant. Moreover, strains A 13 and B 24 supernatants increased the motility of strain PAO1 on 0.5% agar medium.

biofilm

講演番号：3A06-01
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:00～ ミーティングルーム A

高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB27 における短鎖アシル CoA 合成酵素ホモログの構造機能解析

Characterization of Short-chain Acyl-CoA Synthetases of *Thermus thermophilus* HB27

○高島 慶一郎[1]、吉田 彩子[1,2]、富田 武郎[1,2]、葛山 智久[2,3]、古園 さおり[1,2]、西山 真[1,2] ([1]東大・生物工学セ、[2]東大・微生物連携機構、[3]東大院・農生科)
○ Keiichiro TAKASHIMA[1], Ayako YOSHIDA[1,2], Takeo TOMITA[1,2], Tomohisa KUZUYAMA[2,3], Saori KOSONO[1,2], Makoto NISHIYAMA[1,2] ([1]BRC, UTokyo, [2]CRIIM, UTokyo, [3]Grad. Sch. of Agri. and Life Sci., UTokyo)

Acetyl-CoA synthetase (ACS)は、酢酸と CoA から ATP 依存的に、中間体 Acetyl-AMP を経て、Acetyl-CoA を生成する反応を触媒する酵素である。高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB27 は 4 つの ACS ホモログ (ACS1、ACS2、ACS3、ACS4)を有する。中でも、ACS2 は、ACS ドメインと転写制御因子である IclR ドメインからなる特徴的なドメイン構成を持つ。本研究では、*T. thermophilus* の 4 つの ACS ホモログの機能と制御機構の解明を目的とした。

まず、数種の短鎖脂肪酸を基質として用い、4 つの ACS ホモログのアシル CoA 合成活性を調べたところ、ACS1、ACS3、ACS4 は、酢酸、プロピオン酸、酪酸に対して活性を示し、それぞれ基質特異性に違いが見られた一方、ACS2 は活性を示さなかった。また、各 *acs* 遺伝子単一破壊株を作製し、酢酸を単一炭素源とした最少培地にて生育実験を行ったところ、Δ*acs1* に加えて、Δ*acs2* も生育しなかった。このことから、酢酸資化には ACS1 と ACS2 が関与し、ACS2 が *acs1* の転写制御、あるいは ACS1 の活性制御を行う可能性が考えられる。本発表では、ACS2 の結晶構造と、qRT-PCR を用いた各遺伝子の転写解析の結果とともに、各 ACS ホモログの機能およびその調節について報告する。

Acetyl-CoA synthetase (ACS) is an enzyme that synthesizes acetyl-CoA from acetate and CoA in an ATP-dependent manner through an acetyl-AMP as an intermediate. A thermophilic bacterium, *Thermus thermophilus* HB27, has four ACS homologs (ACS1, ACS2, ACS3, and ACS4). Among them, ACS2 has an extra domain, which shows similarity to a transcriptional regulator, IclR, at the N-terminus. In this study, we aimed to elucidate functions of four ACS homologs from *T. thermophilus* HB27 and the underlying regulatory mechanisms in the cells.

We measured the acyl-CoA synthetase activity of each ACS *in vitro*. As a result, ACS1, ACS3, and ACS4 catalyzed acyl-CoA production using acetate, propionate, and butyrate with different substrate preferences. On the other hand, ACS2 did not exhibit the acyl-CoA synthetase activity for the substrates tested. When growth of each *acs*-deleted strain was investigated, the growth defect was observed in Δ*acs1* and Δ*acs2* in the minimal media with acetate as a single carbon source. These results suggest that both ACS1 and ACS2 are involved in acetate utilization and ACS2 is related to the transcriptional regulation of *acs1*expression or ACS1 activity. In this presentation, we will report the crystallographic analysis of ACS2 and transcriptional analysis using qRT-PCR to elucidate the functions of the ACS homologs.

Short-chain acyl-CoA synthetases, *Thermus thermophilus*, Acetate metabolism

講演番号：3A06-02
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:00～ ミーティングルーム A

Hydrogenophilus thermoluteolus TH-1 株の PHB 生合成誘導時における細胞内の状態変化

Metabolic mechanism that drives PHB biosynthesis in *Hydrogenophilus thermoluteolus* strain TH-1

○山本 将大[1]、亀谷 将史[1,2]、新井 博之[1,2]、石井 正治[1,2] ([1]東大院 農生科 応生工、[2]東大微生物連携機構)
○Masahiro YAMAMOTO[1], Masafumi KAMEYA[1,2], Hiroyuki ARAI[1,2], Masaharu ISHII[1,2] ([1]Dept. Biotechnol., Grad. Sch. Agric. Life Sci., Univ. Tokyo, [2]CRIIM, UTokyo)

Hydrogenophilus thermoluteolus TH-1 株は好熱性水素細菌の一種で、水素をエネルギー源、二酸化炭素を炭素源として独立栄養的に生育する。本菌は窒素飢餓状態でポリヒドロキシ酪酸（PHB）を蓄積することが知られ、菌体質量比で最大約 35-50%が PHB へ変換される。しかしこのような急速な蓄積をもたらす代謝収斂が起こるメカニズムはまだ解明されていない。

PHB 生合成では還元力が必要になることから、菌体内酸化還元状態の指標として菌体中の NAD, NADH 量の比に着目した。窒素飢餓条件で培養した菌体において、窒素飢餓条件に置かなかった菌体と比較して NADH/NAD 比の上昇がみられた。このことから、細胞内の酸化還元バランスが還元側に傾くことで、PHB の合成反応が促進されている可能性が考えられた。また TCA 回路と PHB 生合成系がともにアセチル CoA を出発点としていることに鑑み、TCA 回路を構成する酵素の活性測定を行い、窒素飢餓の有無でその活性に変化が見られないか比較した。

Hydrogenophilus thermoluteolus TH-1 is a thermophilic hydrogen bacterium that grows autotrophically using hydrogen as an energy source and carbon dioxide as a carbon source. The bacterium accumulates polyhydroxybutyrate (PHB) under nitrogen-starved conditions, converting about 35-50% of the bacterial mass to PHB. However, the mechanism of metabolic convergence that leads to such rapid PHB accumulation is not yet understood.

We measured the ratio between intracellular NAD and NADH to determine the redox status before and during PHB biosynthesis because reducing power is consumed by PHB biosynthesis.

The NADH/NAD ratio increased under the nitrogen-starved condition compared to that under the normal condition. The result suggests that the intracellular redox balance shifts toward the reductive side during nitrogen starvation, which may promote the synthesis of PHB. Also, since the TCA cycle and the PHB biosynthetic system compete for acetyl CoA as a substrate, we measured the activities of the enzymes in the TCA cycle and compared them between the cells grown with and without nitrogen starvation.

Polyhydroxybutyrate(PHB), TCA-cycle, NADH/NAD ratio

講演番号：3A06-03
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:00～ ミーティングルーム A

放線菌によるルミクロム分解機構の解明

Lumichrome biodegradation mechanism in Actinobacteria.

○鈴木 麻菜美[1]、尾崎 紗代子[1]、土肥 裕希[1,2]、高谷 直樹[1,2]([1]筑波大院生命環境、[2]微生物サステナビリティ研究センター)
○ Manami SUZUKI[1], Sayoko OZAKI[1], Yuki DOI[1,2], Naoki TAKAYA[1,2] ([1]Tsukuba Univ., [2]Microbiology Research Center for Sustainability)

【背景】リボフラビン(ビタミン B_2)は生物の代謝に必須な化合物であり、その生合経路の詳細が明らかにされている。一方、リボフラビンの生分解については、一部の微生物がリボフラビンの五単糖部位を資化し、その代謝副産物としてルミクロムを生産することが知られる。既知のリボフラビン資化性菌によってルミクロムは分解・資化されず、ルミクロムを分解する微生物や分解機構の報告もない。本発表では、当研究室で単離されたルミクロム分解菌 *Nocardioides* sp. L16 および *Rhodococcus* sp. LC-2 のルミクロム分解経路について報告する。
【結果】L16 株と LC-2 株のドラフトゲノム DNA 配列を比較した結果、近縁種には見られず両株間で特異的に保存されている遺伝子クラスターが見出された。いずれの菌株においても、この遺伝子クラスター内にコードされているヒダントイナーゼ様タンパク質の組換え酵素はルミクロムのピリミジン環を開裂してプロダクト-1(P1)を生成し、その下流の遺伝子にコードされているアミドヒドロラーゼの組換え酵素は P1 から NH_3 と CO_2 が脱離したプロダクト-2 を生成した。また、L16 株および LC-2 株の無細胞抽出液におけるこれらの酵素活性は、ルミクロムを添加した培地で明らかに高かった。以上から、L16 株と LC-2 株は、ルミクロム分解酵素の生産を誘導し、同様の反応機構によってルミクロムを分解することが示された。

−***Background***− Riboflavin (vitamin B_2) is an essential cofactor for metabolism in various organisms, and its biosynthesis pathway has been elucidated. Some bacteria degrade riboflavin to pentose, which is a substrate for growth, and lumichrome. Known bacteria as well as the riboflavin-utilizing bacteria are unable to metabolize lumichrome, and bacterial mechanism degrading lumichrome remains unclear. This presentation describes actinobacterial lumichrome metabolisms of *Nocardioides* sp. L16 and *Rhodococcus* sp. LC-2, which our previous study isolated.
−***Results***− Comparative genome analysis found a highly-conserved gene cluster between the draft genome sequences of the strains L16 and LC-2. Hydantoinase-like protein (Hyd) encoded by the gene clusters of both the strains cleaved the pyrimidine ring of lumichrome and produced product-1 (P1, MW=258). A preodicted amidohydrolase (Ami) protein encoded by the genes on the vicinity to *hyd* in the cluster deaminated P1 to product-2 (MW=215). Adding lumichrome to culture medium increased the Hyd and the Ami activities in cell-free extracts of L16 and LC-2. These results indicated that the L16 and the LC-2 strains induced degrading mechanisms of lumichrome, which are comparable between each other.

lumichrome, vitamin, Actinobacteria

発表責任者：高谷直樹（takaya.naoki.ge@u.tsukuba.ac.jp）

講演番号：3A06-04
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:00～ ミーティングルーム A

ルマジン資化性菌の単離とその分解機構

Isolation and characterization of lumazine-utilizing bacteria.

○前田 典歩 [1]、土肥 裕希 [1,2]、高谷 直樹 [1,2] ([1] 筑波大・生命環境、[2] 筑波大・微生物サステイナビリティ研究センター)
○Norifumi MAEDA[1], Yuki DOI[1,2], Naoki TAKAYA[1,2] ([1]Tsukuba Univ., [2]MiCS)

【背景】プテリン誘導体は、色素やビタミンとして様々な生物に含まれている。ルマジンはプテリンの 2 位のアミノ基が脱アミノ化された化合物であり、生体内ではプテリンデアミナーゼ（EC 3.5.4.11）によって生産される。本酵素は様々なプテリン誘導体を脱アミノ化することが可能であり、その基質には葉酸やプテロイン酸も含まれる。しかしながら、これらの脱アミノ化産物の代謝については未知である。本研究では、微生物によるルマジンの生分解に着目した。
【結果】筑波大学・つくば機能植物イノベーション研究センター（T-PIRC）の圃場土壌から、ルマジンを唯一の炭素源として生育可能な LA-1 および LA-2 株を単離した。16S rRNA 遺伝子の解析の結果、これらの株はいずれもβ-Proteobacteria 綱の *Comamonas* 科の *Cupriavidus* 属に含まれる新規細菌であった。LA-1 株のルマジン資化速度は LA-2 株のそれよりも顕著に早く、さらに LA-1 株と LA-2 株で異なる代謝中間体化合物が検出されたことから、両株のルマジン資化経路は異なることが示唆された。また、LA-1 および LA-2 株は共に葉酸をプテロイン酸に変換する活性を有していた。これらの結果は、LA-1 株と LA-2 株は葉酸をプテロイン酸へ分解し、プテロイン酸から生じるルマジン様の脱アミノ化産物を分解することによって、環境中の葉酸循環を担っていることを示唆する。

−***Background***− Pterin derivatives are important organic pigments and vitamins. Pterin deaminase (EC 3.5.4.11) deaminates various pterin compounds including folate and pteroate. Lumazine is a deamination product at the 2-amino position of pterin by pterin deaminase. Mechanism for metabolizing lumazine and its derivatives remain elucidative. Here, we studied bacterial lumazine degradation mechanism.
−***Results***− Lumazine-utilizing bacteria were isolated from agriculture fields in T-PIRC of University of Tsukuba. The isolates LA-1 and LA-2 were grouped into *Cupriavidus* genus of *Comamonas* family in *beta-Proteobacteria* by 16S rRNA gene analyses. The LA-1 strain more efficiently used lumazine than LA-2, and produced potential metabolic intermediates of lumazine, which were different from that of LA-2, indicating that these strains metabolized lumazine by different mechanisms. Cultures of these strains converted folate to pteroate. These results evoke predicted LA-1 and LA-2 strains' role in environmental folate degradation, and assumed the bacterial conversion of folate to pteroate and lumazine.

lumazine, pterin, Cupriavidus

発表責任者：高谷直樹（takaya.naoki.ge@u.tsukuba.ac.jp）

講演番号：3A06-05
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:00～ ミーティングルーム A

連続培養を用いた指向性進化実験による大腸菌のメバロン酸取り込み能力の強化

Directed evolution for enhancing mevalonate uptake ability in Escherichia coli under a continuous culture

○村上 茉奈美[1]、川井 隆太郎[1]、前田 智也[2]、堀之内 貴明[2]、古澤 力[2]、戸谷 吉博[1]、清水 浩[1] ([1]大阪大、[2]理化学研究所)
○Manami MURAKAMI[1], Ryutaro KAWAI[1], Tomoya MAEDA[2], Takaaki HORINOUCHI[2], Chikara FURUSAWA[2], Yoshihiro TOYA[1], Hiroshi SHIMIZU[1] ([1]Osaka Univ., [2]RIKEN)

イソプレノールはバイオ燃料や化成品の有用前駆体であり微生物を用いた生産が望まれている。しかし、メバロン酸経路によるイソプレノールの生合成には多数の酵素反応が関わるため、代謝システムの最適化が困難であった。そこで、生合成経路中間のメバロン酸の合成を担う株とメバロン酸を取り込みイソプレノールの合成を担う株を共培養することで生産性向上を目指している。共培養においては、後半の経路を担う株においてメバロン酸取り込みの強化が課題であった。本研究では、メバロン酸要求性を付与した株を低濃度のメバロン酸を含む培地で連続培養をすることで進化実験を行い、メバロン酸取り込みが強化された進化株を得ることを目的とする。連続培養にはジャーファーメンターを用いて行い、流入培地中のメバロン酸濃度を 50 μM で開始し、約 130 時間後に 5 μM へ変更した。メバロン酸濃度を 5 μM へ変更直後は菌体濃度が低下したが、約 300 時間後にはメバロン酸濃度 50 μM での菌体濃度と同等の菌体濃度に達し、より低い濃度のメバロン酸を取り込んで増殖することが可能な進化株を得ることができた。また、L 型試験管を用いた継代培養によって獲得した進化株と表現型を比較し、培養方法が進化の選択圧に与える影響を明らかにする。

Isoprenol is a useful precursor for biofuels and chemical products and is desired to be produced in microbial fermentation. However, optimization of the metabolic system is difficult because the synthesis of isoprenol through mevalonate pathway involves many enzymatic reactions. This challenge can be solved by co-culture using a strain responsible for the synthesis of mevalonate and a strain responsible for the conversion from mevalonate to Isoprenol. In this approach, it is important to enhance the uptake of mevalonate to achieve high isoprenol production. Here, we performed a continuous culture of the mevalonate auxotrophic strain in the medium supplemented with low concentration of mevalonate to obtain an evolved strain which is enhanced the mevalonate uptake ability. The continuous cultivation was performed in a bioreactor. Initially, concentration of mevalonate in a feed medium was set to 50 μM. After approximately 130 hours, concentration of mevalonate in a feed medium was changed to 5 μM. Although the cell concentration temporarily decreased after changing the mevalonate concentration, it increased to the same level of that under 50 μM of mevalonate after approximately 170 hours. Comparison to the evolved strain obtained by subculture of the same mevalonate auxotrophic strain reveals the effect of different cultivation methods on selection pressure during the evolution experiments.

Directed evolution, Escherichia coli, continuous culture

講演番号：3A06-06
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:00～ ミーティングルーム A

Hybrid-type G protein-coupled receptors AoGprK and AoGprR play important roles for cellular development in *Aspergillus oryzae*

○DONG MIN KIM[1], Ryota YAMADA[1], Minoru YOSHIDA[1,2,3], Manabu ARIOKA[1,2] ([1]Dept. Biotechnol., Univ. Tokyo, [2]CRIIM, UTokyo, [3]RIKEN CSRS)

G protein-coupled receptors (GPCRs) constitute the largest group of transmembrane (TM) receptors in eukaryotes. In *Aspergillus* spp., about 15 GPCR genes have been identified in the genome, which are classified into 9 classes. Despite their possible important roles, their functional properties, such as ligands, modes of G protein coupling, and signaling pathways, are poorly understood. Class VI GPCRs (GprK and GprR) are unique in that they contain, unlike other canonical GPCRs, the regulator of G protein signaling (RGS) domain at the C-terminus. This characteristic hybrid structure is found only in fungal and plant but not in animal GPCRs. Since RGS proteins are known to inhibit GPCR signaling by accelerating the intrinsic GTPase activity of G proteins, how the activation/inactivation of class VI GPCRs is controlled is enigmatic.

Here we report the characterization of class VI GPCRs in *A. oryzae*, AoGprK-1, AoGprK-2, and AoGprR. All the single, double, and triple gene deletion strains showed similar growth and conidiophore formation compared to the control strain. However, although the single deletion strains showed only a slight difference in the formation of sclerotia, a structure assumed to be involved in sexual development, the double deletion strains exhibited a dramatic increase in the number of sclerotia, which was further strengthened in the triple deletion strain. Besides, the RGS domains were functional since they mitigated the hypersensitivity of a yeast mutant lacking Sst2p, an RGS protein involved in pheromone signaling, to α-factor.

To gain insight on the mechanism underlying these phenotypic changes, mRNA levels of genes encoding the key components of sexual development, velvet domain proteins (*velB*, *veA*, and *laeA*), were examined by qRT-PCR. The expression of asexual development-related genes (*brlA*, *abaA*, *wetA*, and *vosA*) was also analyzed. As a result, *velB* mRNA level was found to be increased in the double and triple deletion strains compared to the control and single deletion strains. The expression of *laeA* was slightly increased in the deletion strains, while *veA* level was not affected. These results suggest that increased expression of *velB* resulted dually in the formation of VelB-VeA complex which promotes sclerotia formation and VelB-VosA complex which inhibits conidiation. However, the expression of the asexual-related genes *wetA* and *vosA* was also increased in the deletion strains, indicating that complex transcriptomic reactions occurred upon deletion of class VI GPCR genes. The involvement of RGS domains in the differential regulation of sexual/asexual genes is now being examined.

regulator of G protein signaling (RGS), sclerotia, velvet complex

発表責任者：有岡　学（arioka@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3A06-07
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:00～ ミーティングルーム A

Aspergillus oryzae における G タンパク質共役型受容体の機能および関連タンパク質との相互作用に関する解析

An analysis on the roles of G protein-coupled receptors and their interaction with associated proteins in *Aspergillus oryzae*

○山田 亮太[1]、金 東珉[1]、吉田 稔[1,2,3]、有岡 学[1,2]（[1]東大院農・応生工、[2]東大・微生物連携機構、[3]理研環境資源セ）

○ Ryota YAMADA[1], Dong-min KIM[1], Minoru YOSHIDA[1,2,3], Manabu ARIOKA[1,2] ([1]Dept. Biotechnol., Univ. Tokyo, [2]CRIIM, UTokyo, [3]RIKEN CSRS)

G タンパク質共役型受容体 (GPCR) は 7 回膜貫通型受容体であり、細胞内の G タンパク質と共役し、外的なシグナルに対する細胞内応答を誘導する起点となる。糸状菌において GPCR は分生子形成、発芽や二次代謝、病原性など様々な細胞内プロセスに関与することが知られている。しかし、個々の GPCR がどのような機能を持つか、どのようにシグナルを伝達するかについては未知な点が多い。本研究では目的のタンパク質を一時的に分解する手法、auxin-inducible degron (AID) を *Aspergillus oryzae* に導入し、それを用いて GPCR の機能を解析することを試みた。初めに EGFP をモデルとして使用し、AID を *A. oryzae* において適用した。その結果、他の真核生物において最適条件である 500 mM オーキシン添加条件下では EGFP は分解されなかったが、10 mM まで濃度を上げると分解が観察された。しかし、この分解はオーキシン受容体として働く TIR1 に非依存的だった。現在、AID を利用して *A. oryzae* の持つ GPCR である AoGprK、AoGprR を分解し、その機能解析を行うことを試みている。

併行して GPCR と G タンパク質 a サブユニット (Gα) との相互作用の組み合わせを mating-based split ubiquitin system (mbSUS) を用いて検証した。Gαとの相互作用は GPCR シグナル伝達の起点として非常に重要であるが、*A. oryzae* が持つ 16 個の推定 GPCR が 4 つの Gα (AoGpaA~D) のいずれと相互作用するかは不明である。検討の結果、AoGprB-AoGpaB、AoGprO-AoGpaC、AoGprP-AoGpaB 間において相互作用の可能性が認められた。現在、もう一つのタンパク質間相互作用解析手法である BiFC 法を用いて *in vivo* での相互作用を検証しようと試みている。

G protein-coupled receptors (GPCRs) are seven transmembrane receptors that transduce extracellular signals through their interaction with intracellular G proteins. In filamentous fungi, GPCRs are known to be involved in a variety of cellular processes, such as conidiation, germination, secondary metabolism, and virulence, but the functions of individual GPCRs remain unknown. In this study, we attempted to introduce an auxin-inducible degron (AID), a method that promotes transient degradation of target proteins, into *A. oryzae* to analyze the function of GPCRs. First, using EGFP as a model, we found that the target protein was degraded by the addition of auxin, although the concentration required was significantly higher than that used in other systems. In addition, this degradation was independent of an auxin receptor, TIR1. We are now trying to apply this system to two GPCRs in *A. oryzae*, AoGprK and AoGprR, to analyze their functions.

Besides, we analyzed the interaction between GPCRs and G protein α subunits (Gα) using mating-based split ubiquitin system (mbSUS) and found that the pairs of AoGprB-AoGpaB, AoGprO-AoGpaC, and AoGprP-AoGpaB potentially interact. *In vivo* validation of these interactions using another protein-protein interaction analysis method, BiFC, is in progress.

G protein-coupled receptor (GPCR), auxin-inducible degron (AID), bimolecular fluorescence complementation (BiFC)

発表責任者：有岡　学（arioka@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3A06-08
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:00～ ミーティングルーム A

Functional analysis of secretory phospholipases A2 derived from filamentous fungi

○Sha HUANG[1], Eri SEKIGUCHI[1], Minoru YOSHIDA[1,2,3], Manabu ARIOKA[1,2] ([1]Dept. Biotechnol., Univ. Tokyo, [2]CRIIM, UTokyo, [3]RIKEN CSRS)

【Background and purpose】Phospholipases A2 (PLA2s) are a family of enzymes that catalyze the hydrolysis at the *sn*-2 position of glycerophospholipids. Despite extensive studies on mammalian orthologs, the physiological roles of secretory PLA2s (sPLA2s) in filamentous fungi are poorly understood. We previously reported that while the vast majority of fungal sPLA2s are *bona fide* PLA2s, some display PLA1 activity despite their significant sequence similarity to other sPLA2s. This was surprising since it has been known that sPLA2s including mammalian and venom enzymes show strict *sn*-2 specificity. Further analysis of 'sPLA2s displaying PLA1 activity' such as *Aspergillus oryzae* sPlaB, *Magnaporthe oryzae* MGG01367 and MGG09019, and *Trichoderma reesei* XM006968 demonstrated that the key residue, hereafter termed 'X', near the catalytic HD sequence plays the decisive role in the PLA1/PLA2 regio-specificity; when X is R, the enzyme shows PLA2 activity, while the enzyme is PLA1 when X is Q. In this study, we attempted to obtain further evidence for this hypothesis. In addition, PLA1/PLA2 activity of enzymes containing N and H at position X was examined. Lastly, the physiological functions of 'sPLA2s displaying PLA1 activity' were studied by analyzing the roles of MGG01367 and MGG09019 in the appressorium formation in *M. oryzae*.
【Results】Mass spectrometry analysis demonstrated that MaSP derived from *Metarhizium anisopliae* which possesses Q at X position was PLA1, further supporting our hypothesis. Since the recombinant production in *E. coli* of fungal sPLA2s containing N and H at position X was unsuccessful, we replaced R in p15 (an sPLA2 from *Helicosporium* sp.) and Q in XM006968 with H and N, and examined their catalytic activity. The results showed that the replacement did not affect the regio-specificity, unlike R/Q swapping which caused partial exchange of PLA1/PLA2 activities. We next investigate the physiological functions of 'sPLA2s displaying PLA1 activity'. It has been reported that when *M. oryzae* infects plants and appressoria are formed at the tip of germ tubes, the level of *MGG01367* expression is elevated. We observed that the formation of appressoria was markedly reduced in Δ*MGG01367* strain compared to wild type. In the Δ*MGG09019* strain, although the appressoria formation was only slightly affected, the length of germ tube (the distance between conidium and appressorium) was significantly increased. These results suggest that both sPLA2s in *M. oryzae* with PLA1 activity play distinct but important roles in the infection process of rice blast fungus. Generation of a double deletion strain and its phenotypic analyses are underway.

phospholipase, *Magnaporthe oryzae*, appressorium

発表責任者：有岡　学（arioka@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3A06-09
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:00～ ミーティングルーム A

黄麹菌 *Aspergillus oryzae* のハイドロフォービン HypH の機能解析

Characterization of a hydrophobin HypH from *Aspergillus oryzae*

○金井 優斗、安藤 裕人、菅家 あかり、中島 春紫（明治大農・農化）
○Yuto KANAI, Yuto ANDO, Akari KANKE, Harushi NAKAJIMA (Meiji Univ.)

ハイドロフォービンは、糸状菌や担子菌が生産する両親媒性・低分子量のタンパク質であり、空気中に伸長する菌糸や分生子の表層で自己集合して菌体に撥水性を付与している。1 つの菌株はアミノ酸配列の相同性の低い複数のハイドロフォービン遺伝子を保有し、個々のハイドロフォービンが役割分担を行っていると考えられる。筆者らは、日本国内で広く醸造産業に用いられている黄麹菌 *Aspergillus oryzae* から 9 つのハイドロフォービン遺伝子(*hypA*～*hypI*)を単離しており、これまでの解析で HypA, D, E が分生子に局在し、HypB, C, G が菌糸に局在することを観察している。本研究で対象とする HypH は 198 アミノ酸からなり、8 番目の Cys 残基以降に特有の 62 アミノ酸の機能不明の C 末端領域が存在する。

まず、β-グルクロニダーゼ（GUS）遺伝子をレポーターとして *hypH* 遺伝子の発現条件の解析を行った。その結果、*hypH* 遺伝子は分生子形成期に発現量が最大になること、および培地にポリペプトンなどの窒素源を添加することにより発現量が低下することを観察した。次に、*hypH* 遺伝子破壊株を作製したところ、生育および形態には大きな変化が生じなかったが、分生子形成能が 25～45%低下することを観察した。分生子の主要なハイドロフォービンである *hypA* 遺伝子の破壊株でも同様の表現型が観察されていることから、HypH も分生子形成に関与していると考えられる。

Hydrophobins are amphiphilic, low-molecular-weight proteins produced by filamentous and basidiomycetes, and self-assemble on the surface of aerial hyphae and conidia to confer water repellency to the fungus. We have isolated nine hydrophobin genes (*hypA* to *hypI*) from *Aspergillus oryzae*, widely utilized fungus in the Japanese brewing industry, and have observed that HypA, D, and E are localized in the conidia and HypB, C, and G are localized in the mycelium. HypH, the subject of this study, is composed of 198 amino acids and has a 62 amino acid C-terminal region of unknown function after the eighth Cys residue.

We analyzed the expression conditions of the *hypH* gene using the β-glucuronidase (GUS) gene as a reporter. We observed that the expression of the *hypH* gene was maximized during conidiation and decreased by the addition of a nitrogen source such as polypeptone to the medium. Next, the *hypH* gene disruption strain was generated. The *hypH*-disrupted strain did not show significant changes in growth and morphology, but we observed a 25-45% reduction in conidiation. Since we have already observed the similar phenotypes in the *hypA*-disrupted strain, a major hydrophobin of conidia, it is suggested that HypH is also involved in the process of conidiation.

Aspergillus oryzae, hydrophobin, conidiation

講演番号：3A06-10
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:00～ ミーティングルーム A

アカパンカビにおける SLX1-SLX4 ヌクレアーゼの同定と機能解析

Identification and functional analysis of SLX1-SLX4 nuclease in *Neurospora crassa*

○塚田 耕太郎、吉原 亮平、畠山 晋、田中 秀逸（埼玉大・院理工）
○Kotaro TSUKADA, Ryouhei YOSHIHARA, Shin HATAKEYAMA, Shuuitsu TANAKA (Grad. Sch. of Sci. & Eng., Saitama Univ.)

SLX4 は，SLX1 などのいくつかの構造特異的エンドヌクレアーゼの足場因子として機能することで，組換え，テロメア維持，DNA 鎖間架橋 (Interstrand cross-link, ICL) 修復などに関与する。*SLX1* および *SLX4* は，元々出芽酵母において見つかった遺伝子であるが，特に SLX4 に関しては酵母と高等真核生物の間で配列的にも，機能的にも大きく異なることが示されてきた。

今回我々は，糸状菌であるアカパンカビにおいて *SLX1* および *SLX4* のホモログを新たに同定し，機能解析を行った。SLX4 タンパク質のドメイン解析を行ったところ，種間で高度に保存されている C 末端領域の SAP ドメインと CCD ドメインに加え，後生動物と同様に N 末端領域に MLR ドメインの存在が示唆された。これらの遺伝子欠損株を取得し，ICL 損傷剤である cisplatin への感受性に関してエピスタシス解析を行ったところ，*slx4* とヌクレオチド除去修復 (Nucleotide excision repair, NER) 関連遺伝子である *mus-43* (*XPA* ホモログ) との二重欠損株が相乗的な感受性を示すことが明らかとなった。*slx1* においても，同じく NER 関連遺伝子である *rad23* および *rad26* との二重欠損によって cisplatin に相乗的な感受性を示した。これらの結果から，アカパンカビにおける SLX1-SLX4 は，NER と異なる経路で ICL 修復に関与していると考えられる。

SLX4 is a scaffold protein that interacts with several structure-specific endonucleases including SLX1, and participates in DNA metabolisms such as homologous recombination, telomere maintenance and DNA interstrand cross-link (ICL) repair. Although the SLX1 and SLX4 genes have been identified originally in budding yeast, there seem to be many differences among orthologs of higher eukaryotes notably in their sequences and functions.

In this study, we newly identified these homologues in the filamentous fungus *Neurospora crassa*. The *Neurospora* SLX4 has a well conserved C terminus region containing the SAP and CCD domains and the MLR domain which found exclusively in metazoan SLX4s so far. In order to elucidate the genetic interaction with other known DNA repair pathways, epistasis analyses were performed on the ICL sensitivity of multi-mutant strains harboring deletion of the *slx4* and/or *slx1* genes. The double disruptant of the *slx4* and *mus-43* (*XPA* homologue), which is nucleotide excision repair (NER) factor, showed synergistic sensitivity to cisplatin. The deletion of the *slx1* gene accompanying a knockout of NER-related *rad23* or *rad26* genes also showed synergistic sensitivity to cisplatin. These results suggest that the SLX1-SLX4 nuclease functions independently of the NER pathway in ICL repair in *Neurospora*.

DNA repair, SLX1-SLX4, *Neurospora crassa*

講演番号：3A06-11
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:00～ ミーティングルーム A

循環型汚水浄化槽にいる脱窒菌の探索および脱窒の効率化に向けた検討

Identifying for denitrifying bacteria in the lab-scale circulating wastewater treatment system and investigating for efficient denitrification process.

○政岡 修平、鈴木 智順（東理大応生）
○Shuhei Masaoka, Tomonori Suzuki (Tokyo University of Science.)

汚水処理における硝化および脱窒は、物理的および化学的手法よりも低コストで行える点において魅力的である。水質汚染による富栄養化や健康被害を防ぐうえでは、効率的な窒素除去は必要不可欠である。

本研究では、当研究室で運用している循環型汚水浄化槽を利用し、脱窒に関わる細菌叢の解析および分離株を用いたミクロ生態系実験を行うことで、窒素除去の効率化を目指した。まず、循環型汚水浄化槽から分離された細菌を硝酸塩添加培地で培養し、ガス発生や亜硝酸イオンの確認を行った。そして、脱窒能を有すると推定された細菌株が脱窒関連遺伝子（*nirS*, *nirK*, *nosZ*）を有していることを PCR 法により確認した。選抜された株に対しては 16S rRNA 遺伝子配列に基づく分子系統解析を行い、近縁分類群を推定した。その結果、*nirS* を有している細菌株を 6 株、*nirK* を有している株を 2 株、*nosZ* を有している株を 8 株選抜することができた。また、これらの株が *Pseudomonas* 属, *Sphingobacterium* 属, *Thiopseudomonas* 属細菌と近縁であることがわかった。*Pseudomonas* 属と *Sphingobacterium* 属の脱窒細菌の硝酸塩還元速度を測定した結果、48 h で有意差が見られ、属間における脱窒能の差が考えられた。現在、選抜された脱窒細菌とその他の株を組み合わせてミクロ生態系を構築し、他の株による脱窒への影響および電子供与体（糖やメタノール、酢酸ナトリウム）添加による影響の評価を進めており、併せて発表する予定である。

The nitrification and denitrification processes are more attractive than physical and chemical methods due to their low costs. Efficient removal of nitrogen from wastewater treatment plants is essential to prevent eutrophication and avoid health hazards.

We investigated the denitrification community within our lab-scale wastewater treatment system and constructed the micro-ecosystems using isolates from this system. First, we cultured the isolates in nitrate media and confirmed gas generation and nitrite ion. The denitrifying bacteria were identified by analyses of *nirK*, *nirS*, *nosZ*. The abundance of denitrifying bacteria was determined using the 16S rRNA gene. As a result, we isolated six *nirS*-type bacteria, one *nirK*-type bacterium, which closely related to genera *Pseudomonas*, *Sphingobacterium* and *Thiopseudomonas*. There were significant differences in nitrate reduction rates between PGO3 (*Pseudomonas*) and BSN1S (*Sphingobacterium*) at 48 h. We will also report on the evaluation of the effects of adding other bacteria and electron donors to the denitrifying micro-ecosystem.

denitrification, wastewater, bacteria

講演番号：3A06-12
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:00～ ミーティングルーム A

循環型汚水浄化槽に由来する複合微生物系内での易分解性有機物分解抑制細菌の微生物生態学的研究

Microbial ecology study of bacteria that suppress the decomposition of easily decomposable organic matter in a complex microbial system derived from a circulating wastewater treatment system

○石田 望、鈴木 智順（東理大理工）
○Nozomi ISHIDA, Tomonori SUZUKI (Tokyo Univ. of Science)

汚水浄化における生物学的処理は経済的、環境的に優れている。しかし、汚水浄化における微生物叢の実態についてはほとんど明らかにされておらず、浄化槽内の微生物叢の制御には、経験に則った知識が用いられているのが現状である。本研究以前に、当研究室で運用している循環型汚水浄化槽から分離された細菌 41 株のうち 6 株それぞれを、分離株で構成された複合細菌系へ添加すると、易分解性有機物(EDO)分解を有意に減少させることが明らかとなっている。そこで本研究では、EDO 分解に抑制的に働いている細菌株がどの様なメカニズムで抑制的な作用をしているのかについて解析することで、微生物生態学の基礎的知見を収集、およびより効率的に EDO を分解できる、汚水処理能力の高い浄化槽の構築を目的とした。

人工汚水培地に、浄化槽由来微生物懸濁液（ミクロ微生物生態系）と EDO 分解抑制細菌（EDODSB）をそれぞれ接種した後、異なる振盪条件で培養を行い、経時的に水質測定を行った。さらに、EDODSB が他の細菌の生育を抑制する物質を産生している可能性を検証した。EDODSB は、複合細菌系だけでなく、ミクロ微生物生態系でも EDO の分解を有意に抑制することが示唆された。また、培養条件の比較から、EDODSB は好気的条件でのみ働くことが示唆された。さらに、抗生物質の産生試験では、EDODSB6 株のうち 4 株で他の細菌への生育抑制が示唆された一方、他の 2 株では阻止円が観察されなかった。

Before this study, six bacterial strains that significantly reduced the decomposition of easily decomposable organic matter (EDO) were isolated from the lab-scale circulating wastewater treatment system. It has been clarified that these isolates significantly reduce EOD degradation when added to the mixed culture system composed of bacterial isolates from our tanks. In this study, we analyzed the mechanism by which EDO degradation works in a suppressive manner.

A septic tank -derived microbial suspension and EDO decomposition-suppressing bacteria (EDODSB) were added to the artificial wastewater medium. Then, the cells were cultured under different shaking culture conditions, and the water quality was sequentially measured over time. Besides, an antibiotic test was performed. It was suggested that EDODSB significantly suppresses EDO degradation not only in the mixed culture systems composed of bacterial isolates but also in microbial ecosystems composed of microbiota from our tanks. It was also suggested that EDODSB work only under aerobic conditions. Also, in the antibiotic test, the growth-inhibitory zone was observed in the four strains, but not in the two strains.

wastewater, easily decomposable organic matter, decomposition suppression

講演番号：3A06-13
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:00～ ミーティングルーム A

循環型汚水浄化槽におけるセルロース分解微生物の機能解析

The functional analysis of the microorganisms involved in cellulose degradation in the lab-scale circulating wastewater treatment system

○下村 和正、鈴木 智順（東理大理工）
○Kazumasa SHIMOMURA, Tomonori SUZUKI (Tokyo Univ. of Science)

当研究室では、ラボスケールの循環型汚水浄化槽に生活排水を模した人工汚水を循環させ、浄化に関わる微生物の生態学的な解析を行っている。生活排水にはセルロース成分が含まれているが、循環型汚水浄化槽のセルロース分解に関わる微生物については未だ不明な点が多い。そこで、循環型汚水浄化槽内の微生態学的解析を行い、効率の良い浄化槽の開発につなげることを目的に本研究を行った。

循環型汚水浄化槽内からは細菌 4 株、真菌 27 株のセルロース分解能を持つ菌株がコンゴーレッド法により分離された。分離株それぞれのセルラーゼ活性の測定を DNS 法により行った。特に、Bacillus subtilis と極めて近縁な細菌株が産生するセルラーゼの各種至適条件の検討を行った。その結果、至適 pH は約 5.0、至適温度は約 50℃であり、約 80℃付近でも酵素活性を保つことができる、高い熱耐性を持つことが示された。セルラーゼ遺伝子の発現時期や発現量に基づいた、循環型汚水浄化槽内でのセルラーゼの動態解析も併せて報告する予定である。

In our laboratory, the lab-scale circulating wastewater treatment system is operated to analyze the ecological function of microorganisms involved in purification. The wastewater contains cellulose, but the microorganisms involved in cellulose degradation in the system have not been clarified. Therefore, we selected cellulose-degrading microorganisms in the lab-scale circulating wastewater treatment system, analyzed them enzymatically and ecologically, and conducted this research to develop an efficient wastewater treatment system.

We isolated 4 bacterial strains and 27 fungal strains with cellulose-degrading ability by the Congo red method. Besides, the cellulase activity of each of the isolates was measured by the DNS method. In particular, various optimal conditions for cellulase produced by a bacterial strain closely related to Bacillus subtilis were examined. As a result, it was shown that the optimum pH was about 5.0, the optimum temperature was about 50℃, and the enzyme activity was able to be maintained even at around 80℃, and it had high heat resistance. We also will report the dynamic analysis of cellulase in the lab-scale circulating wastewater treatment system based on the timing of expression and the expression level of the cellulase gene.

cellulose degradation, the lab-scale circulating wastewater treatment system, Bacillus subtilis

発表責任者：下村和正（kazu.volleyball.amazarashi@gmail.com）

講演番号：3A06-14
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:00～ ミーティングルーム A

循環型汚水浄化槽から分離された代謝産物要求細菌の系統解析と代謝産物生産細菌との対応関係の解析

Phylogenetic analysis of metabolite-requiring bacteria and analysis of relationships with metabolite-producing bacteria in the lab-scale circulating wastewater treatment system

○野村 拓哉、鈴木 智順（東理大）
○Takuya NOMURA, Tomonori SUZUKI (Tokyo Univ. of Science)

当研究室で運転している循環型汚水浄化槽から代謝産物要求細菌とヘルパー細菌がこれまでに分離されている。代謝産物要求細菌はヘルパー細菌が産生する物質を生育に必要としている。そこで、代謝産物要求株とヘルパー株との対応関係の確認と、これらの株の系統解析を行い、浄化槽内の細菌の生態や代謝産物を介したネットワークを明らかにすることを本研究の目的とした。

系統解析は 16S rRNA 遺伝子の全塩基配列に基づいて行った。このうち *Aliidiomarina taiwanensis* と最も近縁な B7r, B21r, D12r 株、*Pusillimonas noertemannii* と最も近縁な B22r, D11r, F12r 株に関しては相同値がいずれも 98%未満であり、新種あるいは新属の細菌である可能性が示唆された。

代謝産物要求株とヘルパー株との対応関係の解析では、各ヘルパー細菌の培養上清をそれぞれ用いたときの代謝産物要求株の生育を経時的に追った。結果の一例として、ヘルパー株である JS13h 株の培養上清が代謝産物要求株である 5Fr, H41r 株を生育させた一方、3Cr 株では生育が見られないなどがあり、それぞれのヘルパー株の培養上清に対して特徴的な結果を示したため、代謝産物要求株の生育に必要とするヘルパー株の代謝産物が代謝産物要求株によって異なっている可能性が考えられる。

Metabolite-requiring (MR) bacteria and helper bacteria have been isolated from the lab-scale circulating wastewater treatment system operating in our laboratory. MR bacteria need metabolites produced by helper bacteria to grow. The purpose of this study was to confirm the relationships between these bacteria and to analyze the phylogeny of them to clarify.

The phylogenetic analysis was performed based on the entire sequence of the 16S rRNA gene. Strains B7r, B21r, D12r, which are most closely related to *Aliidiomarina taiwanensis*, and strains B22r, D11r, F12r, which are most closely related to *Pusillimonas noertemannii*, indicated the homology values of less than 98%. These results were suggested to be new taxa of bacteria.

In the analysis of the relationship between the MR strain and the helper strain, the growth of MR strain when the culture supernatant of each helper bacterium was used was sequentially followed. As an example of the results, the culture supernatant of the helper strain JS13h promoted the growth of MR strain 5Fr and H41r, while strain 3Cr did not grow. The metabolites of helper strain required for the growth of MR strains may differ depending on MR strains.

wastewater treatment system, uncultured microorganism, phylogeny

講演番号：3A06-15
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:00～ ミーティングルーム A

循環型汚水浄化槽の難培養細菌が生育に必要とする物質の探索と解明

Search and elucidation of substances required for the growth of hardly culturable bacteria in the lab-scale circulating wastewater treatment system

○鍵山 貴大、鈴木 智順（東理大理工）
○Takahiro KAGIYAMA, Tomonori SUZUKI (Tokyo Univ of Sience)

当研究室で運用しているラボスケール循環型汚水浄化槽内から、他の微生物（ヘルパー細菌）が生産する代謝産物を生育に必要とする難培養微生物（代謝産物要求細菌）が発見されている。本研究の目的は上記生育に必要とする代謝産物（生育物質）の特定である。本研究では、ヘルパー細菌株 *Lysinibacillus sphaericus* (16S rDNA 相同値 99.6%)と 代謝産物要求細菌株 *Alcanivorax pacificus* (96.6%)を使用した。生育物質を特定するため、分離精製および化学的特性評価を行なった。

分離精製では、ヘルパー細菌の培養液を作製後、分液操作を行なった。生育物質が含まれる水層サンプルを順相クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、分取 TLC で分離精製した。純度を確認後、LC-MS, NMR で構造決定を行なった。その結果、生育物質は極性が高く、側鎖が塩基性の両性物質だと推測された。UV-Vis 吸光度の結果から環状構造を持つ物質だと推測された。以上より、生育物質の 1 つはヒスチジンに近い構造だと示唆された。NMR などの解析結果も併せて報告する予定である。

In the lab-scale circulating wastewater treatment system, hardly culturable microorganisms (metabolite-requiring bacteria) that require metabolites produced by other microorganisms (helper bacteria) for growth have been discovered. The purpose of this study is to identify the metabolites (growth substances). We used the helper bacterial strain *Lysinibacillus sphaericus* (16S rDNA homology 99.6%) and the metabolite-requiring bacterial strain *Alcanivorax pacificus* (96.6%). The separation, purification, and chemical property were performed to identify the growing substance.

In the separation and purification, the culture solution of the helper bacterium was prepared, and then the liquid separation operation was performed. Aqueous layer samples containing growth substances were separated and purified by normal phase chromatography, reverse phase chromatography, and preparative TLC. After confirming the purity, the structure was determined by LC-MS and NMR. From the results, it was speculated that the growth substance was highly polar, and the side chain was a basic amphoteric substance. From the results of UV-Vis absorbance, it was inferred that the growth substance had a cyclic structure. From the above, it was suggested that one of the growth substances has a structure similar to histidine.

Metabolites, hardly culturable bacteria, Wastewater treatment

発表責任者：鍵山貴大（piyopiyoking1924@outlook.jp）

講演番号：3A06-16
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:00～ ミーティングルーム A

アミノ酸添加が循環型汚水浄化槽内の微生物や浄化能に与える影響の解析

Analysis of the effects of amino acids additions on microbes and purification capacity in the lab-scale circulating wastewater treatment system

○野口 滉矢、鈴木 智順（東理大理工）
○HIROYA NOGUCHI, TOMONORI SUZUKI (tokyo university of science)

下水は微生物による生物学的処理などにより浄化されている。汚水中には様々な成分が含まれているが、その中の一つにアミノ酸がある。一般的に、アミノ酸は微生物の主要な栄養源であり、代謝でも中心的な役割を果たしている。しかし、汚水浄化における複合微生物系においてアミノ酸がどのような影響を与え、そして浄化能にどの様に反映されるかはあまり知られていない。そこで本研究では、フラスコスケールで好気的な汚水浄化環境を再現し、ここへ任意のアミノ酸を様々な濃度で添加する事により、アミノ酸が複合微生物系に与える影響と浄化能への反映のされ方を検討し、基礎的な知見を収集する事を目的とした。

今回は代謝上、重要なアミノ酸である Glu と Gln を添加した。Glu 添加により pH の上昇が鈍化し、またアンモニア態窒素が増加しにくい傾向となった。異化経路が活性化し有機酸が分泌し、そしてプロテアーゼ合成などの同化経路が次いで活性化してアンモニア態窒素が消費された可能性が考えられる。実際、Glu 添加によりタンパク質残存率が control と比較して低くなった。しかし、これには他の要因も考えられ、現在解析を続けている。また、Gln 添加実験と各条件における細菌叢解析についても発表する予定である。

Wastewater is purified by biological treatment with microbes and contains various components, one of which is an amino acid. In general, amino acids are the main nutrients for microbes and play an important role in metabolism. However, it is known little how amino acids affect microbes related to wastewater treatment and how this effect reflects the ability of wastewater treatment. So, we replicated the environment of aerobic wastewater treatment at flask scale, added amino acid at several concentrations to the flask, and examined the impact of amino acid to microbes related to wastewater treatment and the change of the ability of wastewater treatment.

In this study, Glutamate (Glu) and glutamine (Glu), which are metabolically important amino acids, were added. The addition of Glu slowed the increase of pH and ammonia nitrogen. It is considered that the catabolism is stimulated, microbes release organic acid, the anabolism (like the synthesis of protease) is stimulated, and ammonia nitrogen is consumed. In fact, the addition of Glu reduced the total protein residual rate compared to control. However, there are other possible causes, and the analyses are currently ongoing. We will also present the Gln addition experiment and the bacterial flora analysis under each condition.

wastewater treatment, amino acid, metabolism

講演番号：3B02-01
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:30～ ミーティングルーム B

Selenomonas ruminantium subsp. *lactilytica* TAM6421 株の乳酸資化時におけるエネルギー生産
Energy production in the utilization of lactate in *Selenomonas riminantium* subsp. *lactilytica* TAM6421

○吉井 直毅[1]、樋口 敬太[1]、小野寺 智子[2]、阿部 直樹[1]、金子 淳[1] ([1]東北大農、[2]名寄市立大保)
○Naoki YOSHII[1], Keita HIGUCHI[1], Tomoko ONODERA[2], Naoki ABE[1], Jun KANEKO[1] ([1]Tohoku Univ., [2]Nayoro Univ.)

【目的】偏性嫌気性ルーメン細菌 *Selenomonas ruminantium* subsp. *lactilytica* は 16s rRNA 分類では低 GC グラム陽性菌である *Firmicutes* 門に属するが、ポリアミンが関与する新規機構で保持された外膜を有し新綱 *Negativicutes* 綱に分類される。本菌は、ルーメン内で嫌気的に乳酸を資化してプロピオン酸を排出し、鞭毛を形成して盛んに運動する。一方、*S. ruminantium* subsp. *lactilytica* TAM6421 株のゲノム情報[1)]から、Glc を EMP 経路で解糖し乳酸発酵する遺伝子群、スクシニル-CoA まで還元的方向に進む不完全な TCA 回路の代謝遺伝子群を有するが、酸化的リン酸化に関わる典型的な電子伝達系やキノン生合成系の遺伝子群は欠如していた。一方、F_1F_o型 ATPase の遺伝子群は完全に揃っており、一般的な嫌気呼吸ではない方法で ATPase を駆動すると推定された。また、メチルマロニル-CoA 脱炭酸酵素(MCD)並びに電子伝達タンパク質複合体(Rnf)の二つ遺伝子群を有していた。

本講演では、Glc 資化時と乳酸資化時における RNA-seq 解析から、これら特異な生理に関与する遺伝子群の詳細の発現を確認し、特に乳酸資化時におけるエネルギー生産について考察する。

【方法・結果】Glc (TYG) または乳酸 (TYL) を炭素源とする培地で対数期後期まで培養した菌体から Total RNA を精製し、(株) マクロジェン・ジャパンに委託して RNA-seq データを取得した。TYG 培地、TYL 培地の菌体とも EMP 経路と二つの乳酸脱水素酵素の発現を確認した。乳酸資化時には、糖新生および還元的に succinyl-CoA を生産する経路の遺伝子群で高い発現が見られた。二つの Na^+ 勾配形成に関わる遺伝子群の発現も確認され、F_1 特異的阻害剤 dicyclohexylcarbo- diimide (DCCD)で生育が阻害されることから、乳酸資化時に Na^+ 勾配形成が促進されて F_1F_o型 ATPase が駆動されることが示唆された。現在、これら乳酸資化時のエネルギー生産に関与すると推定された遺伝子の RT-qPCR を用いた定量、Na^+ 濃度の生育及び生産への影響の解析を進めている。

Selenomonas ruminantium subsp. lactilytica can utilize lactate as a sole carbon source. Genomic information of S. ruminantium subsp. lactilytica strain TAM6421 suggests that the bacterium produces ATP by F_1F_o-ATPase to without typical electron transport system.
Here, we performed differential gene expression analysis of S. ruminantium TAM6421 cells grown on lactate as compared glucose via transcriptome sequencing (RNA-seq). Possible motive force for F_1F_o-ATPase under lactate utilization condition will be discussed.

1) J. Kaneko et al., FEMS microbial. lett. 362(9) fnv050 (2015).

Selenomonas ruminantium, differential gene expression analysis, lactic acid utilization

講演番号：3B02-02
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:30～ ミーティングルーム B

Selenomonas ruminantium subsp. *lactilytica* TAM6421 株 由来 乳酸デヒドロゲナーゼの酵素化学的諸性質の解析
Characterization of lactate dehydrogenases from *Selenomonas ruminantium* subsp. *lactilytica* TAM6421
○土屋 果織、武田 慶胤、阿部 直樹、金子 淳（東北大農）
○Kaori TSUCHIYA, Kein TAKEDA, Naoki ABE, Jun KANEKO (Tohoku Univ.)

【目的】ヒツジルーメンより単離された偏性嫌気性細菌 *Selenomonas ruminantium* subsp. *lactilytica* TAM6421 株は、嫌気条件下で乳酸を唯一の炭素源として資化し、ルーメンアシドーシス対抗因子としての重要な役割を担う。本菌はグルコースを資化すると乳酸発酵を行い、乳酸資化時にはピルビン酸から TCA 回路を逆行して糖新生とプロピオン酸生産を行う。いずれの場合にも乳酸デヒドロゲナーゼ（LDH）は代謝の要となる。ゲノム情報 [1]から本菌は二つの独立した L-乳酸デヒドロゲナーゼと推定される遺伝子を持つことわかった。さらに RNA-seq を用いたグルコース資化時・乳酸資化時における遺伝子発現解析はこれらの LDH 発現のパターンが異なることを示した。
本研究では二つの組換え LDH の酵素学的性状を比較し、炭素源の違いと発現の関係の解析を試みた。
【方法・結果】ゲノムから、SrLDH 1 名付けた遺伝子は単独の転写単位と推定され、RNA-seq の結果はグルコース資化時に強く発現することを示した。一方、SrLDH2 は後ろに続く二つの機能未知遺伝子とポリシストロニックな mRNA として転写されると推定され、炭素源に違いに寄らず恒常的に発現していた。二つの LDH 遺伝子を pET22b に組み込み、C-末端に(His)6 タグを付加した融合タンパク質として *E. coli* BL21(DE3) で発現させた。Ni-Sepharose のバッチ法で精製した評品を用い、反応速度パラメーターを解析した。発表では、両 LDH の炭素源による使い分けについて基質特異性とカイネティクスの観点から議論する。

Selenomonas ruminantium subsp. *lactilytica* strain TAM6421 is an anaerobic ruminal bacterium, which utilize lactate as the sole carbon source, and its population increases in response to a rumen lactic acidosis of ruminant[1]. Genomic analysis indicated that strain TAM6421 possesses two different L-lactate dehydrogenase (LDH) genes designated as SrLDH1 and SrLDH2. RNA-seq analysis revealed the differential gene expression between two LDHs was observed in cell cultures grown under the different carbon source of glucose or lactate.
In this study, we analyzed kinetic parameters of these two recombinant LDHs, and carbon source utilization model of S. ruminantium from the perspectives of kinetics and substrate specificity of LDHs will be discussed.
1) Kaneko J, Yamada-Narita S, Abe N, et al. FEMS Microbiol Lett. 2015;362(9)

Selenomonas ruminantium, Lactate dehydrogenase, differential gene expression analysis

講演番号：3B02-03
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:30～ ミーティングルーム B

大腸菌における代謝ステート遷移機構の解析：2-オキソグルタル酸デヒドロゲナーゼ活性化における酢酸とリポ酸化の役割

Analysis of Metabolic State Transition　in Escherichia coli: Roles of Acetate and Lipoylation in 2-Oxoglutarate Dehydrogenase Activation

○中澤 昂太 [1]、田中 寛 [2,3] ([1] 東京工業大学生命理工学院生命理工学系、[2] 東京工業大学生命理工学研究科、[3] 東京工業大学化学生命科学研究所)
○Kota NAKAZAWA[1], Kan TANAKA[2,3] ([1]Tokyo Institute of Technology School of Life Science and Technology Department of Life Science and Technology, [2]Tokyo Institute of Technology School of Life Science and Technology, [3]Tokyo Institute of Technology Laboratory for Chemistry and Life Science)

大腸菌グルコース・ラクトース共存系における２段階増殖（ジオキシー）は広く知られている代謝の切替え現象である。一方で、グルコース・カザミノ酸共存下で大腸菌を培養した場合には、グルコース枯渇に伴うジオキシーのような増殖停止は観察されない。しかし、酢酸オーバーフロー代謝経路の欠損株（*pta* 変異株）では、グルコース枯渇後に数時間もの増殖阻害（強度のジオキシー増殖）が観察され（Shimada and Tanaka, *AEM* 2016）、我々はその原因となる分子機構に興味を持ち解析を進めている。これまでに、*pta* 欠損株では細胞内にピルビン酸が蓄積し、これにより PdhR 抑制下にあるピルビン酸デヒドロゲナーゼ（PDH）が過剰発現していること。その結果、PDH と基質 CoA を競合する関係にある 2-オキソグルタル酸デヒドロゲナーゼ（OGDH）活性化が抑制され、この抑制が結果としてグルコース枯渇以降の増殖を抑制しているとのモデルを構築している。

pta 欠損株では PdhR による発現抑制が解除され、その結果 PDH の過剰発現とジオキシーが観察される。実際、細胞内で強制的に PdhR を過剰発現することで PDH 発現を抑制すると *pta* 欠損によるジオキシーは回復し、上記のモデルでうまく説明することができる。*pdhR* の欠損により PDH を過剰発現しただけではジオキシーは観察されず、PDH と OGDH の競合だけではジオキシーが説明できないことも判明した。今回我々は、この矛盾を詳細に検討し、オーバーフローにより培地中に蓄積した酢酸が OGDH のリポ酸化による活性化に関わる証拠を得たので報告する。OGDH の活性化には３種のタンパク質サブユニットの発現だけでなく、E2 サブユニットのリポ酸化が必須である。*pta* 欠損株ではこのリポ酸化に有意な低下が見られ、この低下が培地中への酢酸添加で回復した。また、*pta* 欠損によるジオキシーが E2 サブユニットのリポ酸化に関わる *lipB* 遺伝子の過剰発現で回復したことからも、リポ酸化段階の調節が OGDH 活性化の制御に深く関わることが示唆された。

In a previous study, we revealed that *Escherichia coli* mutants for acetate overflow metabolism as *pta* and *ackA* showed diauxic growth after glucose depletion in glucose-casamino acids containing minimal media. One reason for the growth lag is accumulation of pyruvate in the cell, which results in overproduction of PDH and competitive prevention of OGDH activation required for the subsequent growth. In this presentation, we will show lines of evidence that acetate which was produced by overflow metabolism is involved in the OGDH activation through lipoylation of the E2 subunit.

E.coli, metabolism, acetate

発表責任者：中澤昂太（nakazawa.k.ah@m.titech.ac.jp）

講演番号：3B02-04
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:30～ ミーティングルーム B

Corynebacterium glutamicum のクエン酸シンターゼ活性低下変異によるリジン生産効率の向上機構の解明

Elucidation of the mechanism of enhanced lysine production by mutation in citrate synthase gene leading to its reduced activity in *Corynebacterium glutamicum*

○大塚 萌音[1]、郭 朕[1]、佐藤 桃梨[1]、愛甲 徹[1]、柳瀬 真紀[1]、吹谷 智[1]、和田 大[2]、横田 篤[1]（[1]北大院農、[2]摂南大農）

○ Mone OTSUKA[1], Zhen GUO[1], Tori SATOH[1], Tohru AIKOH[1], Masaki YANASE[1], Satoru FUKIYA[1], Masaru WADA[2], Atsushi YOKOTA[1] ([1]Hokkaido Univ., [2]Setsunan Univ.)

微生物の生体反応を利用した発酵法は様々な有用物質の生産に用いられており，生産効率の向上を目指して生合成経路の強化や還元力の供給強化などの方法が試みられてきた．

我々はアミノ酸の工業生産に用いられる *Corynebacterium glutamicum* の中枢代謝経路に改変を施すことでリジン生産効率の向上を目指している．これまで，リジン生合成の前駆体であるオキサロ酢酸（OAA）の供給強化に寄与する 3 つの変異を導入し，リジン生産性の向上に効果的であることを示したが，それぞれの変異がどのような機構で生産効率の向上に寄与していたのかは不明であった．本研究では，3 つの変異のうち最も生産性の向上に寄与するクエン酸シンターゼの活性低下変異（CS^{low}）が *C. glutamicum* の中枢代謝に与える影響を検証するため，CS^{low} が導入されたリジン生産株に対して RNA-seq 解析を行った．この結果，CS^{low} 導入株ではグリオキシル酸回路の反応を担う遺伝子の転写量が増加しており，CS^{low} の導入がグリオキシル酸回路を活性化することを見出した．TCA サイクルに比べて炭素の流失が少ないバイパス経路であるグリオキシル酸回路が活性化されることで，効率的に OAA が供給され，リジン生産性が向上したと考察している．

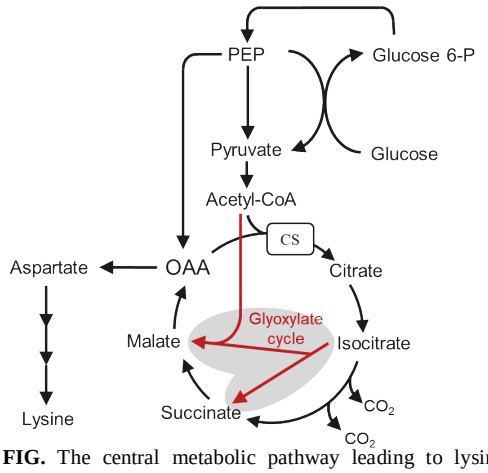


FIG. The central metabolic pathway leading to lysine formation in *C. glutamicum*.

We aim to improve the efficiency of lysine production by *Corynebacterium glutamicum*, which is used for the industrial production of amino acids, through modification of the central metabolic pathway. We have identified three useful mutations for improving lysine productivity possibly through enhanced supply of oxaloacetate (OAA), a precursor of lysine biosynthesis. However, the mechanism by which each of the mutations contributes to the increase in lysine productivity is unclear. In this study, RNA-seq analysis was performed on lysine-producing strains to examine the effect of the mutation in citrate synthase gene leading to its reduced activity (CS^{low}), which is the most effective of the three mutations. We found that the transcript levels of the genes responsible for the glyoxylate cycle reaction were increased in CS^{low}-introduced strains, indicating that CS^{low} activated the glyoxylate cycle. This result suggests that the activation of the glyoxylate cycle, which is a bypass pathway with less carbon loss than the TCA cycle, efficiently supplied OAA and improved lysine productivity.

Corynebacterium glutamicum, lysine production, citrate synthase

発表責任者：横田篤（yokota@chem.agr.hokudai.ac.jp）

講演番号：3B02-05
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:30～ ミーティングルーム B

Corynebacterium glutamicum のリジン生産に対するピルビン酸カルボキシラーゼおよびホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ反応の寄与度の比較

Comparison of contributions of pyruvate carboxylase and phosphoenolpyruvate carboxylase reactions on lysine production by *Corynebacterium glutamicum*

○新森 彰信[1]、郭 朕[1]、吹谷 智[1]、和田 大[2]、横田 篤[1] ([1]北大院農、[2]摂南大農)
○Akinobu SHINMORI[1], Zhen GUO[1], Satoru FUKIYA[1], Masaru WADA[2], Atsushi YOKOTA[1] ([1]Hokkaido Univ., [2]Setsunan Univ.)

Corynebacterium glutamicum は，有用物質の発酵生産に利用されており，本菌の代謝経路に関する基盤知見の獲得は重要である．我々はリジンの前駆体であるオキサロ酢酸（OAA）の供給経路に着目してきた．OAA は主にピルビン酸カルボキシラーゼ（PC）とホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ（PEPC）から構成されるアナプレロティック反応で供給される．各反応の OAA 供給に対する貢献度については過去にも議論されてきたが，相反する報告があり，結論付けられていない．

本研究では上記の貢献度を再評価することを目的として，*C. glutamicum* ATCC 13032 にアスパラギン酸キナーゼのフィードバック阻害解除変異を導入したリジン生産株（P 株）を親株として，PC 欠損株（PΔPC 株）と PEPC 欠損株（PΔPEPC 株）を構築し，2L ジャーファーメンターを用いてリジン生産試験を行った．両欠損株において，生育・糖消費は親株と比べて変化しなかったが，リジン生産の減少が観察された．特に，PΔPEPC 株の最大生産量の減少率（51%）は，PΔPC 株（13%）と比較しても顕著であった．また，PΔPEPC 株でのみ，定常期初期におけるリジン生産の停滞が観察された．これらの結果から，リジン生産において PEPC は PC よりも OAA 供給における貢献度が高いと考えられた．またその貢献度は，生育のフェーズによっても変化することが示唆された．

Corynebacterium glutamicum has been used for the fermentative production of useful products. In this study, we aim to obtain knowledge on the supply of oxaloacetate (OAA), a precursor of lysine. OAA is supplied by anaplerotic reactions consisting of pyruvate carboxylase (PC) and phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC). However, the contribution of each reaction for lysine production OAA supply has not been concluded.

To re-evaluate the contribution, fermentation experiments were performed in a 2L jar fermentor. The strains used for fermentation were the parent strain harboring *lysC*^{T311I} mutation (P), the PC-defective strain (PΔPC), and the PEPC-defective strain (PΔPEPC). In both defective strains, growth and glucose consumption did not change but lysine production was decreased compared to the parent strain. In particular, the rate of decrease in the maximum lysine production of the PΔPEPC (51%) was remarkable compared to that of PΔPC (13%). Also, the lysine production was terminated in the early stationary phase only in the PΔPEPC strain. These results indicated that PEPC is more important than PC in lysine production. It was also suggested that the contribution of each reaction changes depending on the growth phase.

Corynebacterium glutamicum, lysine production, anaplerotic reactions

発表責任者：横田 篤（yokota@chem.agr.hokudai.ac.jp）

講演番号：3B02-06
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:30～ ミーティングルーム B

糖消費速度の変化に応答して発現変動する代謝遺伝子の解析

Expression analysis of metabolic genes in response to modulation of glucose consumption rate

山口 陽[1]、豊田 晃一[2]、和田 大[3]、乾 将行[2]、横田 篤[4]、○柘植 陽太[1,5]（[1]金沢大院自然、[2]RITE、[3]摂南大農、[4]北大院農、[5]金沢大新学術）
Akira YAMAGUCHI[1], Koichi TOYODA[2], Masaru WADA[3], Masayuki INUI[2], Atsushi YOKOTA[4], ○yota TSUGE[1,5] ([1]Kanazawa Univ. Natural System, [2]RITE, [3]Setsunan Univ. Agri., [4]Hokkaido Univ. Agri., [5]Kanazawa Univ. InFiniti)

微生物は中央代謝経路を利用して糖を消費し、増殖・物質生産を行う。解糖系などの中央代謝経路の遺伝子はハウスキーピング遺伝子として発現解析のコントロールに用いられるなど、その発現レベルは一定であるという先入観がある。そこで本研究ではアミノ酸生産菌のコリネ型細菌において、グルコース消費速度を変動させた時の中央代謝経路の発現レベルを検証した。コリネ型細菌は好気条件で増殖してアミノ酸を生産する。一方、嫌気条件では増殖はしないが、グルコースから乳酸やコハク酸を生産する。本研究ではコリネ型細菌をモデルとして、好気・嫌気条件下においてグルコース消費速度の変動に応答して発現変動する代謝遺伝子の探索を目的とした。

好気条件下では糖消費速度が増加する株として ATPase 変異体、減少する株として *ptsG* 変異体を使用した。糖消費速度と解糖系・TCA サイクルの遺伝子群の発現レベルを qRT-PCR により検証した結果、13 遺伝子の発現レベルが糖消費速度と正の相関を示した。一方、嫌気条件下では糖消費速度が増加する手段として炭酸水素ナトリウムの添加、減少する株として *ldhA* 変異株と *ptsG* 変異株を使用した。糖消費速度と解糖系・TCA サイクルの遺伝子群の発現レベルを検証した結果、8 遺伝子の発現レベルが正の相関を示した。

以上の結果により、グルコース消費速度に合わせて細胞が代謝遺伝子の発現レベルを制御している可能性が示唆された。また、好気・嫌気条件下の双方で発現レベルと糖消費速度の相関が見られたことから、この制御機構は酸素の有無に関わらず普遍的であることが示唆された。制御には細胞内代謝物濃度の変動が関わっている可能性が高いため、今後はセンサーとして働く代謝物を探索する予定である。

Microorganisms use the central metabolic pathway to consume glucose for proliferation and production of fermentative products. It is widely believed that gene expression level of the central metabolic pathway is constant. In this study, we aimed at screening of metabolic genes that the expression level is modulated depending on glucose consumption rate in *Corynebacterium glutamicum* both under aerobic and anaerobic conditions. As a result, the expression level of 13 genes in glycolysis and TCA cycle was changed and correlated with the glucose consumption rate under aerobic conditions. Also under anaerobic conditions, the expression level of 8 genes in glycolysis and TCA cycle was changed and correlated with the glucose consumption rate. These results indicated that the expression level of the central metabolic genes are regulated depending on the glucose consumption rate, probably through the changes of intracellular metabolite concentration.

Corynebacterium glutamicum, gene expression, glucose consumption rate

発表責任者：柘植陽太（ytsuge@staff.kanazawa-u.ac.jp）

講演番号：3B02-07
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:30～ ミーティングルーム B

緑茶摂取によって増加する *Flavonifractor plautii* の経口投与は IL-17 の抑制を介して急性大腸炎からの回復を促進する

Oral administration of *Flavonifractor plautii*, a bacteria increased with green-tea consumption, promotes recovery from acute colitis in mice via suppression of IL-17

○三上 彩音[1,2]、荻田 佑[2]、重盛 駿[2]、下里 剛士[2] ([1]信州大院生命医工学、[2]信州大バイオメディカル研)
○Ayane MIKAMI[1,2], Tasuku OGITA[2], Suguru SHIGEMORI[2], Takeshi SHIMOSATO[2] ([1]Dept. of Biomed. Eng., Shinshu Univ., [2]Inst. for Biomed. Sci., Shinshu Univ.)

【Objectives】In inflammatory bowel disease (IBD) is a generic term for chronic inflammatory disease in the gastrointestinal tract, typified by Crohn's disease and ulcerative colitis. Previously, we reported that *Flavonifractor plautii* (FP), which is a common enterobacterium regulates inflammation in obesity model[1]. However, there is limited information on the immune regulatory effects of this bacterium. Therefore, we investigated the effect of FP in an IBD mouse model. We also investigated the effect of the consumption of green tea on the abundance of FP in the gut of mice.

【Methods】Acute colitis was induced in C57BL/6 mice (7 weeks, female) by administration of 3% (w/w) dextran sodium sulfate in drinking water *ad libitum* for 5 days. FP (10^8 CFU/mouse) or PBS was given orally for 10 days. The severity of colitis symptoms was evaluated by body weight, diarrhea and stool consistency. On day 0, 6, 8 and 10, colon length was measured and IL-17 production in colon tissue was evaluated by ELISA. Mice splenocytes (1.0×10^7 cells/mL) were stimulated by IL-6 and TGF-β to induce Th17 differentiation. At the same time, a cell wall component lipoteichoic acid of FP (FP-LTA) was added. IL-17 secretion in the culture supernatants was measured using ELISA. The mice were supplied green tea as a catechin-rich drink, or water *ad libitum* for 10 days. Feces were collected daily and the abundance of FP was measured by qPCR.

【Results】FP treatment significantly lowered the severity of colitis after Day 8. Colon length was longer in the FP group compared to the PBS group on Day 8. Diarrhea and bloody stool scores were improved in mice administered FP on Days 3 and 5, respectively. On Days 6 and 10, IL-17 levels were significantly lower in the colon of the FP group. The addition of FP-LTA reduced the production of IL-17 from Th17. The abundance of FP in feces was increased by green tea supplementation on day 8.

【Conclusion】Th17 cells massively infiltrate the intestine of IBD patients, where they mainly produce IL-17. IL-17 signaling is triggered and amplified during the inflammatory process. In this study, FP treatment suppressed the colitis symptoms and IL-17 production in the recovery phase. In addition, FP-LTA lowered IL-17 levels from Th17 *in vitro*. These results suggest that FP could promote recovery from acute colitis through suppression of IL-17. Furthermore, FP levels were increased by green tea consumption. Thus, oral administration of FP, a bacteria increased by catechin-rich drink, appears to modulate gut inflammation.

【Reference】1. Mikami, A., *et al*., *Molecular Biology Reports*, 47(9), 6717-6725 (2020)

Flavonifractor plautii, IL-17, green tea

講演番号：3B02-08
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:30～ ミーティングルーム B

抗生物質が土壌の性質に与える影響の解析

Physiological analysis of the effects of antibiotics on soil properties

○林 大稀[1,2]、向井 慶一郎[1,3]、小林 桃子[1,2]、保坂 毅[1,2]([1]信州大院・バイオメディカル研、[2]信州大院・総合理工、[3]信州大院・総合医理工)
○Daiki HAYASHI[1,2], Keiichiro MUKAI[1,3], Momoko KOBAYASHI[1,2], Takeshi HOSAKA[1,2] ([1]IBS-ICCER, Shinshu Univ., [2]Grad. Sch. of Sci. and Technol. Shinshu Univ., [3]Grad. Sch. of Med. Sci. and Technol. Shinshu Univ.)

自然界における抗生物質の本当の役割は未だ謎のままである。本研究では、その解明に向けた第一歩として、抗生物質が土壌の性質に及ぼす影響を解析した。

市販の土壌 10 g あたり異なる量（1×10^{-10} g, 1×10^{-7} g, 1×10^{-4} g）の抗生物質を混合し、25℃で 7 日間保持した。各条件の土壌から調製したメタノール及び酢酸エチル抽出物に含まれる成分を高速液体クロマトグラフィーで分析した。加えて、同土壌 10 mg を HV 寒天培地に移し、放線菌の出現パターンを解析した。これらの結果を、抗生物質を含まない条件での結果と比較した。

これまでに、3 種類の抗生物質（クロラムフェニコール、ノボビオシン、ブラストサイジン S）について解析した。いずれの場合も、放線菌の分離パターンへの影響は認められなかった。一方で、3 種類すべての抗生物質が土壌の成分を変化させることが判明した。興味深いことに、その変化は抗生物質ごとに異なること、加えて、混合量が最も多い条件でなくても認められることが明らかになった。現在、他の抗生物質を用いて同様の検討を行っている。

The primary role of antibiotics in the natural world remains unknown. In this study, to better understand the truth about antibiotics, we investigated the effects of antibiotics on soil properties.

A 10 g sample of commercially available soil was mixed with antibiotics at different amounts (1×10^{-10}, 1×10^{-7}, 1×10^{-4} g) and incubated at 25°C for 7 days. Crude ethyl acetate and methanol extracts prepared from antibiotic-treated soils were subjected to HPLC analyses. Furthermore, the emergence patterns of actinomycetes on HV agar medium were analyzed using 10 mg of antibiotic-treated soils. Results obtained from antibiotic-treated soils were compared with those of antibiotic-untreated soils.

The effects of three different types of antibiotics (blasticidin S, chloramphenicol, and novobiocin) on soil properties were analyzed. Evidently, these antibiotics produced changes in the composition of soils, but had no effect on the emergence patterns of actinomycetes. Interestingly, the changes were specific to antibiotics and clearly detectable even in low amounts. We intend to conduct further investigations using various types of antibiotics.

Antibiotics, Soil properties, Actinomycetes

発表責任者：保坂毅（thosaka@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：3B02-09
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:30～ ミーティングルーム B

生物学的処理および光触媒・Boron-doped diamond 電極ハイブリッド式汚水浄化システムの構築と環境影響評価

Assembling and environmental effect evaluation of hybrid wastewater purification system using the biological treatment, photocatalyst, and boron-doped diamond electrode

○久保田 智紀[1]、井手口 真理[1]、佐藤 俊樹[1]、落合 剛[2,3]、藤嶋 昭[2]、鈴木 智順[1,2] ([1]東理大応生、[2]東理大総研、[3]KISTEC)
○Tomoki KUBOTA[1], Mari IDEGUCHI[1], Toshiki SATO[1], Tsuyoshi OCHIAI[2,3], Akira FUJISHIMA[2], Tomonori SUZUKI[1,2] ([1]Depertment of Applied Biological Science, Tokyo University of Science, [2]Research Institute for Science & Technology, Tokyo University of Science, [3]KISTEC)

生活排水を生物学的処理した後に、次亜塩素酸による殺菌処理が現在行われているが、この処理によって生成されるトリハロメタンが環境に有害な影響を及ぼすことが懸念されている。そこで、本研究では、有機物を分解する光触媒と、オゾン等の活性酸素種を生成する boron-doped diamond (BDD)電極を用いて、環境への負荷が少ない汚水浄化システムの構築を行うことを目的とした。本研究では、光触媒・BDD 電極併用処理装置を 200 ml 容ビーカーで構築し、細菌懸濁液や生物学的処理水を投入、反応させ、経時的に反応液を回収した。回収液に対して、コロニーカウント法による殺菌性能評価や有機物分解能を評価することで、本システムの浄化性能を評価した。さらに比色法により次亜塩素酸を含む遊離塩素の定量を行った。

その結果、*Escherichia coli* に対しては 0.5 h で 99.99%、*Bacillus subtilis* 芽胞に対しては、24 h で 99.99 %以上の殺菌性能を示した。また、有機物分解能では、80%の分解が示された。さらに遊離塩素の生成量は BDD 電極単独と比較して、光触媒と BDD 電極を併用することで、90%減少した。以上から、本汚水浄化システムの汚水浄化効率と、光触媒反応が遊離塩素を減少させる可能性が示唆された。

Disinfection treatment with hypochlorite is currently used after biological treatment of domestic wastewater, but the trihalomethane produced by this treatment may hurt the environment. The purpose of this study is to construct an environmentally friendly wastewater purification system using photocatalyst decomposing organic matter and boron-doped diamond (BDD) electrodes producing active oxygen species such as ozone. The purification performance of this system was evaluated by the bactericidal performance and the organic matter decomposition rate. Also, free chlorine including hypochlorite was determined by the colorimetric method.

In this study, the system showed 99.99% bactericidal performance against *Escherichia coli* at 0.5 h and more than 99.99% bactericidal performance against *Bacillus subtilis* spores at 24 h. Also, the organic matter decomposition rate showed 80%. Furthermore, the amount of free chlorine production was reduced by 90% when the system was combined with the photocatalyst and the BDD electrodes compared to the BDD electrodes alone. These results suggest that this wastewater purification system has both high bactericidal efficiency and a high decreasing capacity of free chlorine.

photocatalyst, boron-doped diamond electrode, wastewater purification

講演番号：3B02-10
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:30～ ミーティングルーム B

JFIC 細菌検査技能評価試験の 15 年　-技能試験データの傾向と推移-

JFIC proficiency test 15 years history

○三山 九美、橘田 規、澤田 千尋、廣田 雅光、千葉 博（日本食品検査）
○Kumi MIYAMA, Tadashi KITTA, Chihiro SAWADA, Masamitsu HIROTA, Hiroshi CHIBA (Japan Foods Inspection Corporation)

2000 年代初頭，集団食中毒事件，BSE 問題，産地偽装，残留農薬汚染などの食の安全を脅かす事件が頻発したことを契機に，2003 年 5 月に食品安全基本法が制定され，行政及び食品事業者の食の安全に対する責務が明記された。食品製造業界では適切な衛生・品質管理を行う体制が整備されてゆくと共に，衛生検査の信頼性確保の取り組みが着目されるようになった。このような背景を受けて，食品事業者の自主検査の技術向上と精度管理を支援するため，当法人は 2005 年から「細菌検査技能評価試験」を開始し，現在では ISO/IEC 17043:2010 に基づいた技能試験を提供している。本報告では過去の技能試験参加者の結果をもとに，これまでの傾向等を分析することを目的とした。

事業開始の 2005 年度から 2019 年度までの 15 年分のデータを年度ごとに集計し，*NIQR* の平均を求め参加者のバラつきを比較した。また，同様に標準法と簡易迅速法の利用率を求め，試験法の変化の傾向を分析した。公開するデータは全ての参加者情報が特定されない形で分析した。

NIQR は減少傾向がみられたが，これは技能試験結果より原因分析・改善処置を実施した効果により，参加者の技能向上に本技能試験が貢献したものと考えられる。また，利用培地については当初より簡易迅速法が増加し，作業が簡単で結果が早く得られる方法が求められていると考えられる。

In the early 2000s, there were incidents that threatened food safety, and the Food Safety Basic Act was enacted in May 2003. Therefore, the responsibilities for food safety of the government and food operators were clearly stated, and efforts to ensure the reliability of sanitation inspections had been focused. Against this background, in order to support the technological improvement and quality control of the self-inspection by food business companies, the committee has arranged the proficiency testing programs for microbiology since 2005, and currently provides in accordance with ISO/IEC 17043:2010. The purpose of this study is to analyze the trend of the results of the past proficiency testing participants for 15 years from fiscal 2005 to fiscal 2019.

The average of *NIQR* and the utilization rates of the standard and simplified methods were calculated and compared year by year. The average of *NIQR* was on a downtrend, so it is presumed that the skill of participants has been improving. In addition, the utilization rates of the simplified methods have increased. According to the results, it can be inferred that the way to get quick results and easy work have been needed.

proficiency testing, Microbiology, Food

発表責任者：千葉　博（h_chiba@jffic.or.jp）

講演番号：3B02-11
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:30～ ミーティングルーム B

出芽部位決定における *Saccharomyces cerevisiae* のシグナリング・ムチン Hkr1p の機能
Functions of Hkr1p, a signaling mucin of *Saccharomyces cerevisiae* in bud-site selection.
○今藤 俊宏、奥澤 幹気、小澤 良太郎、伊藤 真広、笠原 紳（宮城大食産業）
○ Toshihiro KONDO, Motoki OKUZAWA, Ryotaro OZAWA, Mahiro ITO, Shin KASAHARA (Miyagi Univ.)

Lindnera mrakii（旧 *Hansenula mrakii*）は、*Saccharomyces cerevisiae* 等の感受性酵母に対して殺菌的に作用する HM-1 キラートキシンを産生する。*HKR1* は *S. cerevisiae* のゲノムから単離された遺伝子で、過剰発現により HM-1 耐性を付与する。その発現産物である Hkr1p はムチン様 I 型膜タンパクで、膜結合型ムチンに特有の構造を有し、細胞内領域にはカルシウム結合モチーフの EF ハンドやロイシンジッパーが認められる。本研究では、Hkr1p の C 末端側の領域を過剰発現させることで HM-1 耐性を獲得した *S. cerevisiae* の細胞では、出芽方向性に乱れが見られることを新たに見出し、また同領域を欠損させた変異体においても同様の現象が認められることを確認した。さらに、HM-1 の影響下にある *S. cerevisiae* の細胞においても、出芽方向性の異常が見られることを見出した。これらは、Hkr1p が何らかの仕組みにより出芽方向性を制御し、また HM-1 が出芽部位選択や細胞極性を制御する経路を標的にしている可能性を示している。これらの結果より、HM-1 の殺菌作用のメカニズムと Hkr1p の過剰発現による HM-1 耐性獲得の機構、出芽部位選択おける役割が解明できるものと期待される。

Lindnera mrakii produces a killer toxin called HM-1 which kills sensitive yeasts including *Saccharomyces cerevisiae*. *HKR1* was originally isolated from the genome of *S. cerevisiae* as a gene whose overexpression overcame the cytocidal effect of HM-1. The gene product Hkr1p is a type I transmembrane protein with the typical features of membrane-associated mucins and the calcium-binding EF hand and Leu zipper motives were found in its cytoplasmic tail. In this study, we observed that the cells over-expressing partial *HKR1* showed altered budding patterns. The mutant cells lacking the cytoplasmic part of Hkr1p showed an aberrant budding pattern, too. From these results, we postulate that Hkr1p might regulate bud-site selection, likely together with other regulator proteins. Moreover, we found that the budding pattern of haploid *S. cerevisiae* cells grown under the influence of HM-1 was also affected. Our observations provided important pieces of information to understand the mechanism of the cytotoxicity of HM-1 and the function of Hkr1p, especially of the cytoplasmic domain in bud-site selection.

budding yeast, signaling mucin, budding pattern

発表責任者：笠原紳（kasahara@myu.ac.jp）

講演番号：3B02-12
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:30～ ミーティングルーム B

Pib2 は TORC1 を直接活性化する細胞内グルタミンセンサーである
Pib2 is a glutamine sensor that directly activates TORC1

○谷川 美頼[1]、山本 勝良[2]、長門石 曉[2]、津本 浩平[2]、能代 大輔[3]、野田 展生[3]、永田 宏次[2]、前田 達哉[1,2] ([1]浜松医科大学、[2]東京大学、[3]微生物化学研究所)
○Mirai TANIGAWA[1], Katsuyoshi YAMAMOTO[2], Satoru NAGATOISHI[2], Kohei TSUMOTO[2], Daisuke NOSHIRO[3], Nobuo NODA[3], Kouji NAGATA[2], Tatsuya MAEDA[1,2] ([1]Hamamatsu Univ. Sch. of Med., [2]Tokyo Univ., [3]Inst. of Microbial Chem.)

TOR 複合体 1 （TORC1）は、アミノ酸をはじめとした栄養源によって活性化され、細胞の成長を促進する栄養応答の枢要をなす分子である。アミノ酸による TORC1 の活性化は、独立した複数の経路を介して引き起こされている。これまで我々は、酵母において、グルタミンが Gtr 複合体（哺乳類 Rag 複合体オルソログ）非依存的に TORC1 を活性化すること、この活性化が液胞膜タンパク質 Pib2 を介することを明らかにしてきた。これらの知見は細胞内に未知のグルタミンセンサーが存在することを示唆しているが、その正体は不明であった。

今回我々は、精製 Pib2 と TORC1 のみを用いた *in vitro* の系において、グルタミンによる TORC1 活性化を観察することに成功した。さらに、Pib2 はグルタミン特異的にフォールディング状態が変化することを見出した。このことは Pib2 がグルタミンセンサーであると同時に TORC1 の直接の活性化因子であることを示している。本研究で得られた知見により細胞内栄養検知、応答の新たなモデルを提唱する。

TOR complex 1 (TORC1) is an evolutionarily-conserved protein kinase that controls cell growth and metabolism in response to nutrients, particularly amino acids. Amino acids activate TORC1 through multiple types of sensing machinery with different amino acid specificities both in yeast and mammals. Previously, we reported that glutamine activates yeast TORC1 via a Gtr (Rag ortholog)-independent mechanism involving the vacuolar protein Pib2, although the precise role of Pib2 in this activation mechanism remains unclear. In this study, we successfully reconstituted glutamine-responsive TORC1 activation in vitro using only purified Pib2 and TORC1. In addition, we found that glutamine specifically induced a change in the folding state of Pib2. These findings indicate that Pib2 is a glutamine sensor that directly activates TORC1, providing a new model for the metabolic control of cells.

amino acid, rapamycin, TORC1

講演番号：3B02-13
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:30～ ミーティングルーム B

酵母ユビキチンリガーゼ Rsp5 の C2 ドメインを介したエンドサイトーシス調節機構
Regulatory mechanisms of endocytosis mediated by the C2 domain of the yeast ubiquitin ligase Rsp5

○棚橋 亮弥、Tira Siti Nur Afiah、西村 明、高木 博史（奈良先端大・バイオ）
○Ryoya TANAHASHI, Siti Nur Afiah TIRA, Akira NISHIMURA, Hiroshi TAKAGI (NAIST・Bio)

真核生物において、細胞膜上の不要なタンパク質はユビキチン化修飾を介したエンドサイトーシスによって液胞（リソソーム）に運ばれ分解・除去される。エンドサイトーシスは、約 60 種ものエンドサイトーシス関連タンパク質が関与する複雑な機構であり、その詳細なメカニズムについては不明な点が多く残っている。酵母 *Saccharomyces cerevisiae* において、HECT 型ユビキチンリガーゼ Rsp5 は、細胞外の窒素源に応答して細胞膜上のアミノ酸パーミアーゼ Gap1 をユビキチン化し、エンドサイトーシスを誘導することが知られている。Gap1 のエンドサイトーシスを効率良く行うため、Rsp5 分子内の各ドメインが協調的に機能することが重要であると考えられているものの、Rsp5 の N 末端側に位置し、細胞膜との相互作用に関わる C2 ドメインの役割は未だ明らかになっていない。そこで本研究では、Gap1 のエンドサイトーシスにおける C2 ドメインの機能解析を行った。

まず、C2 ドメインの機能を解析するため、Rsp5 の C2 ドメイン欠失株を作製した。その結果、興味深いことに、Gap1 のユビキチン化は引き起こされるにも関わらず、エンドサイトーシスは著しい欠損を示した。また、C2 ドメイン内の細胞膜との結合に必要な Lys 残基を Gln に置換したところ、Gap1 のエンドサイトーシスに C2 ドメイン欠失変異と同程度の欠損が見られた。次に、Rsp5 が C2 ドメインの機能を介してエンドサイトーシス関連タンパク質の制御に関与する可能性を検討した。その結果、C2 ドメインの欠失により、細胞膜の陥入を制御する Rvs167 と Rsp5 の相互作用が減弱し、Rvs167 のユビキチン化レベルの低下が見られた。さらに、ユビキチン化が Rvs167 に及ぼす影響を解析したところ、ユビキチン化により Rvs167 の安定性が増大した。以上の結果から、Rsp5 の C2 ドメインは、細胞膜との直接的な相互作用を介して、エンドサイトーシス関連タンパク質の一つである Rvs167 をユビキチン化し、エンドサイトーシスを促進することが明らかになった。現在、Rvs167 のユビキチン化がエンドサイトーシスに及ぼす影響を解析するため、Rvs167 のユビキチン化部位の同定を進めている。

Ubiquitination is a key signal for endocytosis of proteins on the plasma membrane. The ubiquitin ligase Rsp5 of *Saccharomyces cerevisiae* can ubiquitinate plasma membrane proteins directing them for endocytosis. Here, we examined the roles of an amino-terminal membrane-binding C2 domain of Rsp5 in endocytosis for the downregulation of nitrogen-regulated permeases Gap1. Our results showed that the C2 domain of Rsp5 is required for efficient ubiquitination of an endocytic protein (Rvs167) and may facilitate Gap1 endocytosis.

Ubiquitin, Endocytosis, yeast

講演番号：3B02-14
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:30～ ミーティングルーム B

出芽酵母の RTG 経路の活性化は、ジヒドロスフィンゴシンの細胞毒性を増強する

Activation of RTG pathway increases cytotoxicity of dihydrosphingosine in budding yeast

○高山 千廣、古賀 綾乃、有田 頌彬、坂本 理沙、谷 元洋（九州大理）
○ Chihiro TAKAYAMA, Ayano KOGA, Nobuaki ARITA, Risa SAKAMOTO, Motohiro TANI (Kyushu Univ.)

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* においてスフィンゴ脂質は生体膜脂質二重層の主要成分の一つであり、生育に必須となる脂質である。ジヒドロスフィンゴシン(DHS)、フィトスフィンゴシン(PHS)は、酵母のスフィンゴ脂質の基本骨格となる長鎖塩基構造である。 通常、PHS, DHS は細胞に微量しか存在しないが、ストレス応答、エンドサイトーシス制御等において重要な役割を果たしていることが報告されている。これまでに我々は、細胞内で DHS が過剰に蓄積すると、ミトコンドリア由来の活性酸素種の増大を介した細胞死が誘導され、その細胞毒性は PHS よりも強いことを見出した（*FEBS J* (2020) 287, 3427–3448)。本研究では、DHS の細胞毒性発揮のメカニズム解明を目指し、細胞外から添加した DHS に対して抵抗性を付与する変異遺伝子（サプレッサー変異)の探索を行い、3 個の遺伝子を同定した。この中には、細胞のミトコンドリア機能を活性化させる Mitochondrial retrograde signaling pathway (RTG 経路)の活性化に関与する *RTG2* が含まれていた。
RTG 経路と DHS の細胞毒性との関連性を調べるために、RTG 経路の変異株を作製し、DHS に対する感受性を詳しく調べた。その結果、RTG 経路を負に調節する *MKS1* あるいは *LST8* の変異株では、DHS の細胞毒性が顕著に上昇していることが確認された。また、*MKS1* または *LST8*変異による DHS 高感受性は、RTG 経路の転写因子をコードする *RTG3* の欠損によって回避されることも確認された。これらの結果は、RTG 経路の活性化が DHS の細胞毒性を増強させることを示している。一方で、ミトコンドリアが発達する非発酵性炭素源を含む培地では、野生株の DHS に対する細胞毒性が顕著に上昇することが確認された。これらのことを総合すると、ミトコンドリア機能の活性化が、DHS の細胞毒性の増強に繋がることが示唆された。

Sphingolipids, which have sphingoid long-chain bases as the core structure, are essential for growth of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *S.cerevisiae* has two types of long-chain bases, phytosphingosine (PHS) and dihydrosphingosine (DHS). Previously, we found that intracellularly accumulated DHS causes mitochondrial reactive oxygen species-mediated cells death, and the cytotoxicity is much more potent than PHS. In this study, we screened suppressor mutations that confer resistance to DHS, and identified *RTG2* encoding component of the mitochondrial retrograde (RTG) signaling pathway. Mutation of *MKS1* or *LST8*, which negatively regulates the RTG pathway, confers hypersensitivity to accumulation of DHS. Furthermore, the cytotoxicity of DHS was enhanced when cells were grown in nonfermentable carbon sources. These results suggested that activation of mitochondrial function causes increase in the cytotoxic activity of DHS.

sphingolipid, yeast, mitochondria

発表責任者：谷　元洋（tani@chem.kyushu-univ.jp）

講演番号：3B02-15
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:30～ ミーティングルーム B

エタノールストレスからのリカバリーにおける Btn2 分解機構と天然変性領域の役割

Ethanol responsive regulation of the expression and turnover of yeast aggregase Btn2.

○清水 涼、井澤 真吾（京工繊大応生）
○Ryo SHIMIZU, Shingo IZAWA (Kyoto Inst. Technol.)

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の Btn2 は aggregase として変性タンパク質を隔離・凝集し、INQs/JUNQs(Intranuclear Quality/Juxta-Nuclear Quality control compartment)などの deposition site を形成する。Deposition site の形成は、変性タンパク質の毒性が細胞内に拡散することを防ぐと共に、変性タンパク質の効率的な分解やリフォールディングを可能にすると考えられている。Btn2 の発現レベルは Hsf1 を貸した転写活性化とともに ubiquitin-proteasome system(UPS)による分解によって制御されている。そのため、Btn2 タンパク質は非ストレス下でほとんど確認できないが、42℃の熱ショックや 10%エタノールストレス下では発現が誘導され、高いレベルを維持する。一方、エタノールを除去すると Btn2 は速やかに分解される。本研究では、エタノール除去後に Btn2 が分解除去される機構について、各種変異体を用いて解析を行った。Btn2 は N 末端側に核移行配列(NLS)と C 末端側に天然変性領域(intrinsically disordered region)を持つ。そこで、NLS を除去したΔNLS や天然変性領域を削ったΔCTD などの Btn2 変異体を発現する株を構築し、エタノール除去後の Btn2 分解効率や細胞内の分解場所などを解析した。また、エタノールストレス下やストレス除去後のプロテアソーム構成因子の局在変化についても検討した。Btn2 はエタノールを除去した際の細胞内 proteostasis の速やかな回復に寄与することから、Btn2 の速やかな分解が持つ生理的意義についても検討中である。

Btn2 plays an important role as an aggregase(sequestrase)in the assembly of deposition site, which assist the sequestration of toxic denatured proteins. Btn2 protein level is usually low but is drastically increased by heat shock and severe ethanol stress. On the other hand, Btn2 protein level is quickly decreased to the basal level during the recovery process from severe ethanol stress. We analyzed the mechanism of quick Btn2 degradation, using deletion mutants of NLS and intrinsically disordered region of Btn2. Changes in the intracellular localization of proteasome components under ethanol stress and after stress removal were also examined. Since Btn2 contributes to the rapid recovery of intracellular proteostasis after ethanol removal, the physiological role of the rapid degradation of Btn2 was also evaluated.

proteasomal turnover, intrinsically disordered region, ethanol stress

講演番号：3B02-16
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:30～ ミーティングルーム B

エタノールストレス下の酵母プロテオスタシスにおける細胞内トレハロースの寄与

Effects of intracellular trehalose on the proteostasis of yeast cells under ethanol stress conditions

○今井 竣也、Vo Nguyet、福田 志津、井澤 真吾（京工繊大応生）
○Shunya IMAI, Nguyet VO, Shizu FUKUDA, Shingo IZAWA (Kyoto Inst. Technol.)

トレハロースは、alpha-glucose が 1,1-グリコシド結合してできた二糖類であり、凍結や乾燥ストレスなどから細胞を保護することが報告されている。また、タンパク質に対しても構造の安定化や変性・凝集の防止効果を持つことが報告されているが、*in vivo* での効果の検証は十分に行われていないのが現状である。本研究では、高濃度エタノールによって引き起こされる酵母細胞内のタンパク質変性に対するトレハロースの効果を検証した。解析には野生株とともにトレハラーゼを欠損させたトレハロース蓄積株 (*nth1*Δ*nth2*Δ*ath1*Δ)とトレハロース合成系の trehalose-6-P synthase を欠損した株(*tps1*Δ)を用いた。対数増殖期後期では、*nth1*Δ*nth2*Δ*ath1*Δが野生株の 8～10 倍のトレハロース含量を示したのに対し、*tps1*Δのトレハロース含量は野生株より低かった。各株を 10% (v/v)のエタノールで処理したところ、野生株と *nth1*Δ*nth2*Δ*ath1*Δ株の間でユビキチン化タンパク質と不溶性タンパク質の細胞内レベルに有意な違いが認められた。また、6% (v/v)エタノールでの前処理によって誘導される高濃度エタノールへの耐性獲得については、野生株と *tps1*Δ株の間で違いが見られた。これらの結果より、エタノールストレス下での酵母の proteostasis に対する細胞内トレハロースの寄与が確認された。

Trehalose is well known to protect cells from various kinds of stress including freezing and desiccation stress. Although it has also been reported that trehalose stabilizes protein structures and prevents protein denaturation and aggregation, its effects *in vivo* have not been well examined. In this study, we examined the effects of trehalose on yeast protein denaturation caused by severe ethanol stress, using a trehalose-accumulating strain lacking trehalases (*nth1*Δ*nth2*Δ*ath1*Δ) and a strain lacking trehalose-6-P synthase in the trehalose-synthetic system (*tps1*Δ). When each strain was treated with 10% (v/v) ethanol, there were significant differences in the intracellular levels of ubiquitinated and insoluble proteins between wild-type cells and *nth1*Δ*nth2*Δ*ath1*Δcells. Differences were also observed between wild-type cells and *tps1*Δ cells in terms of acquired resistance to severe ethanol stress induced by pretreatment with 6% (v/v) ethanol. These results confirmed that intracellular trehalose is involved in yeast proteostasis under ethanol stress conditions.

trehalose, ethanol stress, proteostasis

講演番号：3B02-17
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:30～ ミーティングルーム B

新規たばこ製品の化学的および生物学的特性

Chemical and Biological Characterization of Aerosols Generated from Novel Tobacco Products

○福島 俊朗、伊藤 浩士、堺 優花、海谷 京香、高橋 智裕、橋爪 恒夫（日本たばこ産業株式会社）
○ Toshiro FUKUSHIMA, Hiroshi ITO, Yuka SAKAI, Kyoka KAIYA, Tomohiro TAKAHASHI, Tsuneo HASHIZUME (Japan Tobacco Inc.)

紙巻たばこの主流煙は数千もの化学物質から構成されており、その多くはたばこ葉が燃焼することによって生成することが知られている。その中には WHO が健康上のリスクの観点から含有量の低減を優先して推奨している成分が含まれており、近年、これら成分の低減を企図した新たな製品が販売されるなど、たばこ製品の多様化が進んでいる。成分を低減する代表的な技術として、たばこ葉の燃焼を介さず、加熱によってベイパーを発生させる機構が挙げられ、前者と区別するため加熱式たばこと称されるが、たばこ葉を加熱する温度は既販されている製品間で異なる。本発表では、たばこ葉の加熱温度の違いに着目し、2 種類の加熱式たばこを取り上げ、化学的および生物学的特性の観点で紙巻たばこと比較、検討した。
紙巻たばことして、リファレンスシガレット（1R6F）、加熱式たばことして、加熱温度が異なる 2 種類の製品（DT2.0a：たばこ内部温度が約 200℃、IT2.0a：同温度が約 40℃）を用いた。化学的特性を調査する上で、ISO20778 で規定された条件に従って機械喫煙により発生させた煙／ベイパー中のニコチンやたばこ特異的ニトロソアミンなどの 46 成分を測定した。また、生物学的特性を調査する上で、3 種の *in vitro* 試験、すなわち医薬品の安全性評価等で用いられる微生物を用いた変異原性（Ames）試験及び培養細胞を用いた遺伝毒性（小核）試験、医療機器の安全性評価で用いられる細胞毒性試験を実施した。なお、*in vitro* 試験では、ガラス繊維フィルターに吸着させた煙／ベイパーの粒子相成分を DMSO に溶解させた溶液､及び蒸気相成分をリン酸緩衝液に溶解させた溶液を用いた。
成分分析の結果、1R6F 主流煙では対象 43 成分が検出されたのに対して、DT2.0a ベイパーではニコチンやアンモニアの他、たばこ特異的ニトロソアミン（TSNA）類、一部カルボニル類、一部フェノール類及び酸化窒素類が 1R6F 主流煙に対して最大 10%程度の量で検出され、IT2.0a ベイパーでは、ニコチンおよびアンモニアの他、一部 TSNA 類及び一部カルボニル類が最大 5%程度の量で検出された。一方で Ames 試験、小核試験および細胞毒性試験のいずれにおいても、1R6F 主流煙では明確な用量依存性をもって反応が認められたのに対して、両加熱式たばこベイパーでは 1R6F 主流煙が反応を示した用量を大きく超える水準においても反応が認められなかった。
加熱式たばこベイパーに検出される成分数及び検出量は加熱温度を上げることによって増加するものの、*in vitro* 試験による反応の違いに影響する変化ではないと考えられた。総じて、いずれの加熱式たばこにおいても紙巻たばこと比較し、大きく異なる化学的、生物学的特性を示す結果であった。

Vapor, Chemical analysis, *in vitro*

発表責任者：福島　俊朗（toshiro.fukushima@jt.com）

講演番号：3B04-01
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:30～ ミーティングルーム B

同一不和合性群に属する塩基組成の異なるプラスミドの宿主域比較

The host ranges of plasmids belonging to the same incompatibility group could be different due to their different nucleotide composition

○徳田 真穂[1]、鈴木 治夫[2]、雪 真弘[3]、大熊 盛也[3]、金原 和秀[1]、新谷 政己[1,3,4] ([1]静大院・総合科技、[2]慶大・環境情報、[3]理研・BRC-JCM、[4]静大・グリーン研)
○Maho TOKUDA[1], Haruo SUZUKI[2], Masahiro YUKI[3], Moriya OHKUMA[3], Kazuhide KIMBARA[1], Masaki SHINTANI[1,3,4] ([1]Grad. Sch. Shizuoka Univ., [2]Environment & Info. Studies, Keio Univ., [3]BRC-JCM, RIKEN, [4]Shizuoka Univ. RIGST)

プラスミドは，接合伝達によって微生物間を移動することで，微生物の進化・適応に寄与している可動性遺伝因子である．我々は，同一不和合性群（IncPromA）に属し遺伝子構成が類似するのに，GC 含量に最も大きな違いで 10%の違いがある他，コドンの使用頻度や連続塩基の出現頻度等といった塩基組成が異なる 4 本のプラスミドを環境より取得した．これまでに公的データベース上のゲノム配列からプラスミドと宿主染色体の塩基組成は類似するといった特徴が報告されており，例えばプラスミドの GC 含量は宿主染色体よりも 5-10%低いことも知られている(1)．以上の点から，上記 4 本のプラスミドの宿主域が異なる可能性が示された．本研究では，プラスミドの塩基組成の違いが宿主域の違いを生むのか実験的に検証するため，環境試料中の微生物群集との接合実験によって上記のプラスミドの宿主域を比較した．同時に，公的データベース上の 1887 株の細菌染色体ゲノムを用いて，各プラスミドとの 3 連続塩基組成の類似度を算出し，それぞれのプラスミドと染色体の塩基組成がどのくらい類似しているか順位付けを行った．接合実験の結果，466 株の接合完了体を取得し，その全 15 門の 18 科のうち，全プラスミドに共通した宿主となったのは 4 科に留まった．また，466 株のうちの 93%以上（437 株）が，塩基組成の類似度に基づく順位の上位 50%以内に含まれた．以上から，4 本のプラスミドの宿主域は互いに異なること，プラスミドの塩基組成と宿主域に相関があることが示された．現在は，得られた接合完了体自体の塩基組成との比較を行っている．

Plasmids are mobile genetic elements that can be transferred between various bacteria and promote rapid evolution and adaptation of their hosts. The four plasmids we obtained previously belong to the same incompatibility group (IncPromA) and have different nucleotide composition. Because some studies showed that the nucleotide compositions of plasmids and host chromosome were similar by *in silico* analyses (1), the host ranges of the above four plasmids were expected to be different. We compared the host ranges of these plasmids by conjugation assays. *In silico* analyses could show 'host ranking' based on similarity of trinucleotide compositions between each plasmid and chromosomes of 1887 bacteria in public database. As a result, 466 transconjugants belonging to 15 orders, 18 families were obtained and only four families were common to all four plasmids. In addition, more than 93% genera of 466 transconjugants were ranked as top 50% in 'host ranking'. These results suggested that the host ranges of these four plasmids were different and their nucleotide composition were correlated to the host ranges.

(1) Shintani & Suzuki, 2019, Plasmids and Their Hosts. In: Nishida H., Oshima T. (eds) DNA Traffic in the Environment. Springer, Singapore

Plasmid, host range, nucleotide composition

発表責任者：新谷政己（shintani.masaki@shizuoka.ac.jp）

講演番号：3B04-02
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:30～ ミーティングルーム B

黄麹菌 Aspergillus oryzae の GPI アンカー型アスパラギン酸プロテアーゼ oryzapsin の機能解析
Analysis on physiological functions of the GPI-anchored asparatic endopeptidases, oryzapsins in Aspergillus oryzae

○清水 奈津乃、山形 洋平（東京農工大学）
○NATSUNO SHIMIZU, YOUHEI YAMAGATA (Tokyo University of Agirculture and Technology)

Aspergillus oryzae のゲノム情報より、出芽酵母の GPI アンカー型アスパラギン酸プロテアーゼ yapsin のホモログとして、3 つの oryzapsin 遺伝子が見出された（*opsA, opsB, opsC*）。これらのうち *opsC* は偽遺伝子であることが示唆されている。*opsA*、*opsB* は、酵母 yapsin との基質特異性等の違いが示されているのみで、未だ *A. oryzae* における oryzapsin の生物学的機能は明らかになっていない。我々は、oryzapsin が GPI アンカー型タンパク質であることから細胞壁構築に関与し、 cell wall integrity (CWI) 経路のシグナル伝達に関与しているのではないかと考え、*opsA* 破壊株, *opsB* 破壊株, *opsA, opsB* 二重破壊株, *opsC* 破壊株での CWI 経路に関わる遺伝子の転写解析を行った。その結果、*opsA, opsB, opsC* 欠損株の全てで CWI 経路が活性化し、CWI 経路に存在する *mpkA* 遺伝子の転写量が増加がみられ、OpsA, OpsB は yapsin 同様、細胞壁合成に関与するタンパク質のプロセッシングに関わっていることが示唆された。そこで細胞壁攪乱剤で各欠損株を処理したが、欠損株と control 株とで生育の違いが観察されなかった。oryzapsin の機能の特定には、遺伝子の網羅的な解析が必要であると考え RNA-seq 解析を行ったところ oryzapsin は細胞膜の生合成に関与すると示唆され、エルゴステロール合成阻害剤を添加すると oryzapsin 欠損株でコロニー直径がしたことから、oryzapsin はエルゴステロール生合成に関与していることが示唆された。

Three GPI-anchored asparatic proteases (*opsA, opsB, opsC*) were found from the genome information of *A. oryzae* as homologues of *Saccharomyces cervisiae* yapsin. It has been suggested that *opsC* is a pseudogene. The biological function of oryzapsin has not yet been clarified. As oryzapsins are GPI-anchored enzyme, it was considered that oryzapsins might be involved in cell wall construction and the cell wall integrity (CWI) pathway. Therefore, we observed the transcription patterns of CWI pathway-related genes in oryzapsin deficient strains. Consequently, CWI pathway was activated in oryzapsin deficient strains and the transcription of *mpkA* was increased. Thus, it was suggested that OpsA and OpsB would be implicated in the processing of proteins involved in cell wall synthesis as yapsin. Accordingly, we treated the deficient strains with cell wall disruptors. However, there was no difference between the growth of deficient strains and that of the control strain. For father analysis, RNA-seq analysis was performed with the deficient strains, and it was suggested that oryzapsin might be involved in cell membrane biosynthesis. Furthermore, an ergosterol synthesis inhibitor showed growth supression of the oryzapsin deletant strains. The results suggested that oryzapsin should be involved in ergosterol biosynthesis.

Aspergillus oryzae, gpi-anchored protein

発表責任者：清水奈津乃（tonarinototoro7272@gmail.com）

講演番号：3B04-03
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:30～ ミーティングルーム B

Comparative genomic analysis of the Pink Pigmented Facultative Methylotrophs (PPFM)

○ Ola Alessa[1], Nurettin Sahin[2], Yoshitoshi Ogura[3], Tetsuya Hayashi[4], Akio Tani[1] ([1]IPSR, Okayama Univ., [2]Fac. Edu., Mugla Sitki Kocman Univ., [3]Dep. Infect. Med., Kurume Univ., [4]Grad. Sch. Med. Sci., Kyushu Univ.)

The pink-pigmented facultative methylotrophs (**PPFMs**), which belong to the *Methylobacteriaceae* family, are a group of gram-negative methylotrophic bacteria. These bacteria are associated with plants, and some show plant growth promotion activity, by either producing phytohormones (auxin, cytokinin, and gibberellin), secondary metabolites, or exoenzymes that can reduce pathogen infection. This group includes 61 species belonging to two genera *Methylobacterium* and *Methylorubrum* (which was recently proposed). We aimed to understand the taxonomy and phenotypes of this group by comparative genomics approach. We newly sequenced the genomes of 25 species. Average nucleotide identity (ANI), digital DNA-DNA hybridization(dDDH), and core- and pan-genome analysis was done for taxonomic analysis. Detailed phenotyping on methylotrophy and traits for plant-interaction were examined. Based on the ANI and dDDH values, we propose some species to be reclassified into sub species. 703 core genes were identified, and the phylogeny based on the core genes grouped the PPFMs into three main groups (A, B and C). *Methylorubrum* (group B) cluster in a very unified group genetically and phenotypically, the other two groups were highly divergent. Whereas the methylotrophy genes were highly conserved in *Methylorubrum* group, only one type of methanol dehydrogenase gene cluster (XoxF) was conserved within the soft-core genome of all the strains. Many other unique traits revealed by comparative genomics have been experimentally confirmed.

Methylobacterium Methylorubrum, Methylotrophy genes, core and pan genome

講演番号：3B04-04
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:30～ ミーティングルーム B

バイオｘデジタル：スマートセルプロジェクトで得られた生産性データ・オーミクスデータの DB 化
Biotechnology and Digital Information: Construction of the database of the results for productivity and -omics generated in the smart-cell project.
○外内 尚人[1]、北橋 優子[1]、木村 明音[1]、光山 統泰[2]、市川 夏子[1]([1]製品評価技術基盤機構、[2]産業技術総合研究所)
○Naoto Tonouchi[1], Yuko Kitahashi[1], Akane Kimura[1], Toutai Mitsuyama[2], Natsuko Ichikawa[1] ([1]NITE, [2]AIST)

2016 年度から 2020 年度まで実施された NEDO プロジェクト「植物等の生物を用いた高機能品生産技術の開発／高生産性微生物創製に資する情報解析システムの開発」では、バイオテクノロジーとデジタル技術の進歩によって「スマートセル」を超高速に育種する技術の開発と有効性検証を目的として、多くの実施機関において研究が進められた。

このプロジェクトにおいては、研究の過程で大量の生産性データ・オーミクスデータが取得されたが、これらデータは今後の情報解析技術の開発にも利用可能な非常に貴重なものであり、プロジェクト終了後も一元的に保存・管理される必要がある。NITEでは、生物資源とその関連情報を登録・利用できるプラットフォームであるDBRP（Data & Biological Resource Platform*）を開発・公開しており、このシステムを利用してプロジェクトで得られたデータを収録した。
プロジェクトでは、各課題で実験ごとに実験の種類・試料・実験条件等を記入するシートを作成して、統一された書式で実験に関する情報が集積されていた。各課題の実施機関が記入したシートを用いてDBRPの形式に合わせて変換し登録を行った。その結果、プロジェクトで得られたデータが課題毎に整理され、また実験機器や実験条件でも検索できるようになった。本プロジェクトで登録されたデータの一部はDBRPから公開される予定である。
*https://www.nite.go.jp/nbrc/dbrp/about/

In a NEDO project for the efficient development of "smart cells", many research subjects were carried out, using recently progressed biotechnology and information technology. A large amount of productivity data and -omics data acquired in this research process are extremely valuable for the development of information analysis method, so they should be stored together as a database even after the project is completed. NITE has developed a DBRP* system; that allows registration and use of biological resources and related information. In the project, a data sheet for each experiment, which describes conditions and used equipment, was accumulated in a unified format. Using the filled sheet, experimental information was converted and registered according to the DBRP format. As the result, the data is organized by subject, and it has become possible to search by experimental equipment and experimental conditions. Some of the data of this project registered will be released by DBRP.

smart cell project, biodigital information, DBRP

発表責任者：外内尚人（tonouchi-naoto@nite.go.jp）

講演番号：3B04-05
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:30～ ミーティングルーム B

麹菌 *Aspergillus oryzae* が有する特異的な染色体領域の発見とゲノム編集技術 CRISPR/Cas9 による大規模欠損

Discovery of a specific chromosomal region of *Aspergillus oryzae* and large-scale deletion using genome editing technology CRISPR/Cas9

○知見 悠太[1]、山口 勝司[2]、齋藤 直也[1]、片山 琢也[1,3]、重信 秀治[2]、丸山 潤一[1,3]（[1]東大院・農生科・応生工、[2]基生研、[3]東大 微生物連携機構）
○ Yuta CHIKEN[1], Katsushi YAMAGUCHI[2], Naoya SAITOU[1], Takuya KATAYAMA[1,3], Shuji SHIGENOBU[2], Jun-ichi MARUYAMA[1,3] ([1]Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo, [2]NIBB, [3]CRIIM, UTokyo)

麹菌 *Aspergillus oryzae* は日本の伝統的な醸造産業に用いられ、高い酵素活性を示すなどの醸造特性をもつが、その遺伝的なメカニズムは理解されていない部分が多い。さらに *A. oryzae* において、日本酒・醤油・味噌などの製造の用途に適した多様な株が存在する。我々は *A. oryzae* においてゲノム編集技術 CRISPR/Cas9 システムを確立し、あらゆる株において高効率の遺伝子改変を可能にした[1)]。本研究では、*A. oryzae* の株ごとのゲノム情報比較により特異的な染色体構造を探索して、これを対象としてゲノム編集技術を用いた大規模な欠損を行った。

野生株 RIB40、およびこれと異なる接合型株 AO6 について、PacBio シーケンサーを用いたロングリードのゲノム配列解析を行った結果、祖先とされる *Aspergillus flavus* の NRRL3357 株にはない、*A. oryzae* に特異的な染色体領域(約 120 kb)の存在が示唆された。また驚くことに、これと相同性を示す染色体領域が醤油麹菌 *Aspergillus sojae* にも存在し、その祖先とされる *Aspergillus parasiticus* の SU-1 株には存在しないことがわかった。以上の結果から、見いだした特異的領域が日本の醸造微生物に関係することが示された。そこで、特異的領域の機能を調べるためゲノム編集技術により大規模欠損を行い、取得した株において酵素生産能など醸造特性に関する影響を解析する予定である。

1) Katayama *et al.* (2019) *Appl. Environ. Microbiol.* 85:e01896-18.

Aspergillus oryzae, the filamentous fungus used in Japanese traditional brewing industry, has specialized brewing characteristics, but the genetic mechanisms are not fully understood. There are numerous *A. oryzae* strains suitable for various manufacturing applications such as sake, soy sauce and *miso*. In this study, we searched for a specific chromosomal structure by comparing the genomic information of *A. oryzae* strains, and performed large-scale deletion using genome editing technology CRISPR/Cas9 system.

Genome sequence analysis of wild strain RIB40 and a different mating-type strain AO6 revealed the existence of a chromosomal region (~120 kb) specific to *A. oryzae* strains. Surprisingly, a homologous chromosomal region is also present in *Aspergillus sojae*, the filamentous fungus used for soy sauce production, suggesting a possible relation of the specific region to Japanese brewing microorganisms. Large-scale deletion of the specific region is being performed by CRISPR/Cas9 in various strains, and then the brewing characteristics such as enzyme production ability will be investigated.

Aspergillus oryzae, chromosome, CRISPR/Cas9

発表責任者：知見　悠太（chiken-yuta928@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3B04-06
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:30～ ミーティングルーム B

コリネ型細菌を宿主とする誘導発現系の構築

Construction of an indusible expression system in *Corynebacteria*

○山本 修也[1]、泉 悠樹[1]、積田 悠平[1]、加藤 雄己[2]、川崎 寿[3]、夏目 亮[1,2]([1]東電大院・工、[2]東電大・工、[3]東大・生物工学セ)
○Shuya YAMAMOTO[1], Yuki IZUMI[1], Yuhei TSUMITA[1], Yuki KATO[2], Hisashi KAWASAKI[3], Ryo NATSUME[1,2] ([1]Grad. Sch. of Eng., Tokyo Denki Univ., [2]Dept. of Eng., Tokyo Denki Univ., [3]Biotech. Res. Center, Univ. of Tokyo)

Corynebacterium glutamicum は、biotin 制限、Tween40 添加、Penicillin G 添加などの特定のストレスに応答して自身の代謝フレックスを変化させてグルタミン酸を過剰に生産する。これまでの研究で、グルタミン酸過剰生産時に転写量が増加する遺伝子が複数見出されている。その一つ、機能未知タンパク質 PUF3 の遺伝子はグルタミン酸過剰生産に関与することが最近分かってきた。この遺伝子の上流域にはストレス応答性のプロモーター（PUF3 プロモーター）があると考えられる。本研究では、この PUF3 プロモーターを含む配列を利用して、Penicillin G の添加操作によって組換えタンパク質の発現を誘導する系を構築した。大腸菌などの他の発現系では発現量が少ないタンパク質を、細胞の生理状態が特にグルタミン酸過剰生産時に大腸菌とは大きく異なる *C. glutamicum* を宿主として発現させると発現量が改善する可能性があるためである。組換えタンパク質の発現／精製量をはっきり評価するために、緑色蛍光タンパク質 GFP を最初の発現ターゲットとした。GFP 精製量を指標に、GFP 発現コリネ型細菌株の培養条件を検討／評価した。最も好成績な条件では、100 mL の培養液で培養した細胞から 0.5 mg 以上の組換え GFP が精製できた。現在 PUF3 プロモーター配列の同定を試みている。

Corynebacterium glutamicum overproduces glutamic acid by changing its metabolic flux in response to the specific stresses, such as biotin-limitation, Tween40-addition or Penicillin G-addition. In the previous study, it was found that transcriptions of several genes were enhanced during glutamate overproduction. One of those, the gene of Protein of Unknown Function 3 (PUF3), was shown to be involved in glutamate overproduction, recently. These findings suggest that there is a stress-responsive promoter (PUF3 promoter) on the upstream region of this gene. In this study, with PUF3 promoter-containing sequence, we constructed an expression system to induce recombinant protein production by Penicillin G-addition. The expression of some proteins, which expression levels were low in commonly used expression hosts such as *Escherichia coli*, would be improved by using *C. glutamicum* as a host, because the physiological properties/conditions of *C. glutamicum*, especially in overproducing glutamic acid, are significantly different from those of *Escherichia coli*. As a first target, Green Fluorescent Protein (GFP) was selected in order to clarify the amount of expressed/purified protein. The culture conditions of GFP-expressing *C. glutamicum* were investigated and scored by the amounts of purified GFP. Under the most favorable conditions, more than 0.5 mg of recombinant GFP was purified from cells cultured in 100 mL of culture medium. Currently, attempts to identify the sequence of PUF3 promoter are being made.

Corynebacterium glutamicum, Indusible expression system, Stress-responsive promoter

発表責任者：Ryo NATSUME（natsume@mail.dendai.ac.jp）

講演番号：3B04-07
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:30～ ミーティングルーム B

コリネ型細菌誘導発現系を用いた組換え発現

Recombinant expression of proteins by an indusible expression system in *Corynebacteria*

○泉 悠樹[1]、山本 修也[1]、積田 悠平[1]、加藤 雄己[2]、川崎 寿[3]、夏目 亮[1,2]([1]東電大院・工、[2]東電大・工、[3]東大・生物工学セ)
○Yuki IZUMI[1], Shuya YAMAMOTO[1], Yuhei TSUMITA[1], Yuki KATOU[2], Hisashi KAWASAKI[3], Ryo NATSUME[1,2] ([1]Grad. Sch. of Eng., Tokyo Denki Univ., [2]Dept. of Eng., Tokyo Denki Univ., [3]Biotech. Res. Center, Univ. of Tokyo)

我々のグループでは、*Corynebaccterium glutamicum* を宿主とする新規なタンパク質発現系の構築を試みている。その理由は、次のような組換え発現宿主として魅力的な特性が本菌に備わっているためである。i) *C. glutamicum* はグラム陽性の非病原菌である。ii) *C. glutamicum* は遺伝子組換え操作が可能である。iii) *C. glutamicum* は、*Escherichia coli* の培養で普段用いている実験設備で培養できる。*E. coli* とのシャトルベクターを利用できるため、*E. coli* を宿主とする系からの移行が容易である。*C. glutamicum* の生理的特性は *E. coli* とは大きく異なるため、*E. coli* を宿主とした際には組換え発現が困難なタンパク質でも、*C. glutamicum* を宿主とした際にはうまく発現するかもしれない。最近我々は、薬剤の添加に応答して下流の遺伝子発現を増大させる誘導性プロモーターが含まれている配列を見出した。その配列を利用して組換え発現系を構築した結果、*C. glutamicum* を宿主とした組換え発現系でも十分な量の GFP を発現／精製できるようになった。今回、この系を用いた数種類の別のタンパク質の組換え発現例を紹介する。

Our team is attempting to construct a novel protein expression system in *Corynebaccterium glutamicum*, because *C. glutamicum* has the following attractive properties as a host for recombinant expression system. First, *C. glutamicum* is a gram-positive and non-pathogenic bacterium. Second, techniques for genetic-modification of this organism are established. Third, *C. glutamicum* can be cultured using the laboratory equipment/facilities commonly used for culture of *Escherichia coli*. Since a shuttle vector for *E. coli* and *C. glutamicum* is available, it is easy to change the expression host from *E. coli* to *C. glutamicum*. Even if some proteins could not be expressed or folded in *E. coli*, those proteins would be successfully expressed or folded in *C. glutamicum*, as the physiological characteristics of *C. glutamicum* and *E. coli* are significantly different. Recently, a DNA sequence containing an inducible promoter that upregulates the expression of its downstream gene in response to the addition of reagents to the culture medium has been found. It was utilized to construct an inducible recombinant expression system in *C. glutamicum*. By using this system, Green Fluorescent Protein (GFP) was over-expressed and sufficient amounts of GFP was purified. In this presentation, several examples of recombinant expression of other proteins using this system will be shown.

Corynebacterium glutamicum, Indusible expression system, Stress-responsive promoter

発表責任者：Ryo NATSUME（natsume@mail.dendai.ac.jp）

講演番号：3B04-08
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:30～ ミーティングルーム B

Paenibacillus 属由来の新規 GH43 β-キシロシダーゼの特性

Characterization of a novel GH43 ß-xylosidase from *Paenibacillus xylaniclasticus*

○伊藤 太一[1]、中野 咲梨[2]、白﨑 里菜[3]、梅川 碧里[1]、苅田 修一[1]([1]三重大院生物資源、[2]三重大生物資源、[3]三重大院地域イノベーション)
○Daichi ITO[1], Emiri NAKANO[2], Rina SHIRASAKI[3], Midori UMEKAWA[1], Shuichi KARITA[1] ([1]Graduate shcool of Bioresources, Mie Univ., [2]Fuculty of Bioresources, Mie Univ., [3]Graduate School of Regional Innovation Studies, Mie Univ.)

セルロース系バイオマスに対して高い分解活性を示す好気性細菌 *Paenibacillus xylaniclasticus* TW1 株は、多数の糖質加水分解酵素をコードする遺伝子を有する。TW1 株のゲノムシークエンスのオープンリーディングフレーム予測により、糖質加水分解酵素ファミリー43(GH43)と相同性があり、機能未知タンパク質を持つ酵素が発見された。そこで本研究では、この酵素の触媒モジュールと機能未知タンパク質の機能を解析することを目的とした。

触媒モジュール及び機能未知タンパク質を作製し、基質特異性の決定、結合定数の測定を行った。触媒モジュールは不溶性キシランに対して分解活性を示さず、*p*-ニトロフェニル-β-D-キシロピラノシドを基質としたこと、また、重合度 2 から 5 までのキシロオリゴ糖からキシロースを生成したことから、β-1,4-キシロシダーゼ活性を持つことが分かった。機能未知タンパク質は不溶性キシランに対して結合し、その結合定数 K_a は $2.0\times10^5\ M^{-1}$ であり、高い相同性を持つタンパク質が確認されなかったことから、機能未知タンパク質は新規の糖質結合モジュールであると結論付けた。

Paenibacillus xylaniclasticus strain TW1 is a mesophilic, facultative, anaerobic and xylanolytic-cellulolytic bacterium which grows on xylan as the sole carbon source. It has many genes of carbohydrate-active enzymes, at least, 29 glycoside hydrolases(GH) and 24 carbohydrate-binding modules(CBMs). ORF analysis of TW1 genome sequence indicated that one of these enzymes consists a GH family 43 catalytic module and unknown region, but the function of both of modules is unclear. In this study, we analyzed the substrate specificity and its binding to it of the enzyme.

The catalytic module and the unknown region were expressed and measured a yield of products and binding constant K_a .The catalytic module is a β-1,4-xylosidase, because it exhibited *p*-nitrophenyl-β-D-xylopyranoside activity and yielded xylose from xylooligosaccharides. The unknown region bound to oat-spelt xylan with K_a of $2.0\times10^5\ M^{-1}$. Therefore, this region was proposed as a novel CBM.

lignocellulose degradation, ß-xylosidase, carbohydrate-binding module

発表責任者：伊藤太一（520D301@m.mie-u.ac.jp）

講演番号：3B04-09
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:30～ ミーティングルーム B

Streptomyces sp. 1355 由来グルコースオキシダーゼの精製と諸性質

Purification and some properties of glucose oxidase from *Streptomyces* sp. 1355

○増田 佳南、谷 修治、炭谷 順一、川口 剛司（阪府大院・生環科）
○Kana MASUDA, Syuji TANI, Jun-ichi SUMITANI, Takashi KAWAGUCHI (Osaka Pref. Univ.)

グルコースオキシダーゼ（GOx）はβ-D-グルコースからδ-グルコノラクトンへの酸化反応を触媒する酵素であり、グルコース測定用酵素センサや食品添加物として応用されている。既存の GOx を含む糖質オキシダーゼは、最近報告されたピラノース 2-オキシダーゼを除いて、すべてカビや酵母などの真核生物由来である。我々は土壌を分離源としたスクリーニングにより、GOx を生産する放線菌を獲得し、16S rRNA 解析の結果、Streptomyces sp. 1355 と命名した。これまで細菌由来の GOx は報告されていないため、Streptomyces sp. 1355 由来 GOx の諸性質やその構造，結合する補欠分子族など興味が持たれるところである。そこで、本菌株培養液から本酵素を各種クロマトグラフィーにかけることで電気泳動的に均一に精製した。その結果、ゲル濾過によって本酵素の分子質量は約 200 kDa と見積もられたが，SDS-PAGE では約 70 kDa と約 27 kDa のバンドが観察され，本酵素はヘテロテトラマーであることが示唆された。現在、他の諸性質について検討しているところである。

Glucose oxidase (GOx) is the enzyme which catalyze oxidation reaction of β-D-glucose to δ-gluconolactone, and which has been applied to enzyme sensor for blood glucose measurement and food additive. Almost all of known carbohydrate oxidases including GOx are derived from eukaryote except for recently reported pyranose 2-oxidase. We successfully isolated actinomycete producing GOx from soil. From the result of 16S rRNA analysis, the islated actinomycete named *Streptomyces* sp.1355. The characteristic, construction and prosthetic group of GOx produced by *Streptomyces* sp.1355 would be interesting because bacterial GOx has not been reported so far. Therefore, the enzyme was purified from culture supernatant using various chromatographies. As a result, molecular mass of this enzyme is estimated approximately 200 kDa, but the result of SDS-PAGE, approximately 70 and 27 kDa protein bands are observed, suggesting that the enzyme is comprised of a heterotetramer. Other properties of the enzyme is now under investigation.

Glucose oxidase, Streptomyces

講演番号：3B04-10
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:30～ ミーティングルーム B

A breeding strategy of ribosome engineering for probiotics enhances the adhesion to human colonic mucin in *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG

○Fu NAMAI, Suguru SHIGEMORI, Takeshi SHIMOSATO (IBS., Shinshu Univ.)

[Objective]
Lactic acid bacteria (LAB) have been widely accepted as probiotics, improving the quality of life. However, the health benefits of probiotic LAB are known to vary in the individual host response. Here, we focused on Ribosome engineering (RE) as a breeding strategy for probiotic LAB. RE can modify the transcription and translation in bacteria by inducing spontaneous mutation by antibiotics targeting ribosome and/or RNA polymerase. In this study, we applied RE using streptomycin (SM) to *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG (LGG) and investigated its effects.
[Methods]
LGG was cultured in MRS broth containing SM (256 μg/mL) to induce the spontaneous mutation in *rpsL* encoding ribosomal S12. The mutation in *rpsL* was verified by sequencing. LGG-WT and mutant (LGG-MT) were cultured for 24 hr and supernatant was subjected to SDS-PAGE. Proteins particularly altered were identified by PMF analysis and Western blot. The abundance of Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase (GAPDH), a protein with expression level changed, on the cell surface was verified by immunofluorescence staining. Morphological observations of LGG-WT and LGG-MT_{K56N} were performed by scanning electron microscopy (SEM). The adhesion ability of LGG-MT against type A human colonic mucin was investigated using the Biacore system.
[Results]
Eight types of LGG-MT harboring mutation in *rpsL* were obtained. Compared with LGG-WT, LGG-MT with K56N mutation in *rpsL* (LGG-MT_{K56N}) secreted a high amount of approximately 40 kDa protein, GAPDH identified by PMF analysis and Western blot. GAPDH plays a key role in the adhesion to colonic mucin in LAB. LGG-MT_{K56N} significantly expressed GAPDH on the cell surface compared with LGG-WT. In addition, LGG-MT_{K56N} showed enhanced adhesion to human colonic mucin in the experiment using Biacore system. As a result of SEM, cells of LGG-MT_{K56N} were smaller in diameter than that of LGG-WT and were curved in contrast to the linear shape of LGG-WT.
[Reference]
Ishida *et al.*, *Appl Environ Microbiol*., 86:e01448-20, 2020.

Lacticaseibacillus rhamnosus GG, Ribosome engineering, human colonic mucin

発表責任者：下里剛士（shimot@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：3B04-11
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:30～ ミーティングルーム B

Stenotrophomonas maltophilia エステラーゼの活性解析と機能向上の試み

Enzymatic characterization and functional improvement of a *Stenotrophomonas maltophilia* esterase

○前田 謙太郎[1]、矢田 凪紗[2]、土橋 大地[1]、阿野 貴司[1,2]、岡南 政宏[1,2]（[1]近畿大院・生物理工、[2]近畿大・生物理工）
○ Kentaro MAEDA[1], Nagisa YADA[2], Daichi TSUTHIHASHI[1], Takashi ANO[1,2], Masahiro OKANAMI[1,2] ([1]Grad. Sch. Biol. Ortd. Sci. Technol., Kindai Univ., [2]Fac. Biol. Ortd. Sci. Technol., Kindai Univ.)

エステラーゼは動物, 植物, 微生物に広く存在する加水分解酵素である。中でも微生物のエステラーゼは，動植物のエステラーゼと比較して一般的に広範な温度および pH において高い活性を示し，広い基質特異性を有する。そのため，生分解性プラスチックをはじめとするポリエステル化合物の効率的分解などへの利用が期待できる。我々は，これまでに，*Stenotrophomonas maltophilia* 4A 株からエステラーゼ活性をコードする遺伝子を単離している。本研究では，この遺伝子がコードするタンパク質(X-Pro)を組換えタンパク質として大腸菌内で発現させ精製すること，および，アミノ酸置換を導入することによって機能を向上させることを目的とした。しかし, 全長タンパク質を低温で発現誘導しても不溶性画分に移行して精製できなかった。発現システムや培養温度など様々な条件を試行した結果，N 末端から 20 アミノ酸を削除した $X\text{-}Pro_{21\text{-}525}$ を His タグ付きタンパク質として発現させることによって，高いエステラーゼ活性を保持したまま精製することができた。精製されたエステラーゼの活性特性を解析した結果，30~45℃，pH6~8 という比較的広い範囲で高い活性を示し，中鎖脂肪酸エステルに対する基質特異性と高い基質親和性を持つことが分かった。本講演ではこれらの結果に加えて，アミノ酸置換による酵素の機能向上の試みについても報告する予定である。

Microbial esterases are in general more stable than animal and plant ones and therefore may be expected for use of biotechnological applications. We have isolated a microbial strain, *Stenotrophomonas maltophilia* 4A, which exhibited a high esterase activity. A strain 4A genomic DNA fragments were screened and subsequently a gene encoding for an esterase (X-Pro) has been isolated. Full-length proteins were bacterially expressed under various conditions. The expressed proteins, however, were insoluble and could not been purified. His-tagged X-Pro protein lacking 20 amino acids of the amino terminus ($X\text{-}Pro_{21\text{-}525}$) was successfully purified. This truncated protein displayed a strong esterase activity at a broad range of temperature and pH, a substrate specificity against medium chain fatty acid esters and a high affinity to substrates. We will present the results of functional improvement of the enzyme by amino acid substitutions.

Stenotrophomonas maltophilia, Esterase, Enzymatic characterization

発表責任者：前田謙太郎（2033710005p@waka.kindai.ac.jp）

講演番号：3B04-12
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:30～ ミーティングルーム B

枯草菌の加熱損傷芽胞の発育過程における Thymol の抑制作用の解析

Analysis of the suppressing effect of thymol on the development from heat-injured spores

○岡田 太地[1]、朝田 良子[1,2]、坂元 仁[2]、土戸 哲明[2]、古田 雅一[1,2]([1]大阪府大院・工・量子、[2]大阪府大・研究推進機構・微制研セ)
○ DAICHI OKADA[1], RYOKO ASADA[1,2], ZIN SAKAMOTO[2], TETUAKI TSUCHIDO[2], MASAKAZU FURUTA[1,2] ([1]Grad. Sch. Eng., Osaka Pref. Univ., [2]Res. Ctr. Microorg. Control, Org. Res. Promot., Osaka Pref. Univ.)

［目的］細菌芽胞は種々の殺菌処理に抵抗性であり、処理後に生残して食品の安全性・健康性を損なうことが懸念される。芽胞の発育には発芽, outgrowth から栄養増殖に至る連続的なプロセスがあり、より有効な殺滅菌効果を得るには併用処理が有効とされる。しかし、その有効性を最大限に発揮させるためには、個々の殺菌処理が発育のどの段階で作用を及ぼすのかを把握することが重要である。演者らは [1)]加熱処理後に精油成分の Thymol を培地に添加すると枯草菌損傷芽胞に対して複合効果が得られることを報告した。本研究では個々の発育プロセスに分けて熱と Thymol の併用効果を解析した。解析には殺菌作用の評価も可能な改変アイソボログラム図（未発表）を適用した。
［方法と結果］枯草菌 168 株芽胞を用いた。加熱処理芽胞をクロラムフェニコール入りの TSB 培地に添加し、発芽以降のプロセスへの進行を阻害することで発芽に対する複合効果を解析した。その結果、発芽速度に対しては併用による相乗効果は得られなかったが、発芽率も減少させた。次にナリジクス酸入りの TSB 培地に発芽した芽胞を添加することで outgrowth 速度に対する複合効果を解析した。その結果、outgrowth に対しても相加的な効果と判定された。栄養増殖への効果は現在検討中である。
Bacterial spores are highly resistant to various sterilization methods and thus there are risks of food spoilage and poisoning by them. The development from spores involves a continuous process consisting of germination, outgrowth and the subsequent vegetative growth, and for more effective sterilization, it is preferable to know which stage is the most effective in spore control. In our previous studies[1)], we have reported a combined effect of thymol with heat against *Bacillus subtilis* spores. In this study, we analyzed the suppressing effect of the heat and thymol in the individual stage of the development by using a modified isobologram diagram, which was newly proposed. *B. subtilis* 168 spores were prepared and heated in potassium phosphate buffer at pH 7. The development from spore in TSB medium was chased with the OD monitor. The combined effect on germination was analyzed in the presence of chloramphenicol. As a result, only additive effect was obtained from the evaluation of the germination rate, whereas, the germinability was drastically reduced. For the analysis of the combined effect on outgrowth, the above germinated spores were added to TSB medium containing nalidixic acid. The resultant effect on the outgrowth rate was found to be additive between heat and thymol. The effect on vegetative propagation is currently under investigation.
1) 岡田ら、日農化学大会要旨集、3A18a07（2020）

Bacterial spores, Heat injury, Thymol

講演番号：3B04-13
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:30～ ミーティングルーム B

UV-C 処理芽胞の発育動態解析に基づく損傷評価

Injury evaluation based on the growth kinetics analysis of UV-C irradiated *Bacillus subtilis* spores

○朝田 良子[1,2]、堀切 茂俊[2]、秋吉 優史[1]、坂元 仁[2]、土戸 哲明[2]、古田 雅一[1,2]（[1]大阪府大院・工、[2]大阪府大・研究推進機構・微制研セ）
○Ryoko ASADA[1,2], Shigetoshi HORIKIRI[2], Masafumi AKIYOSHI[1], Jin SAKAMOTO[2], Tetsuaki TSUCHIDO[2], Masakazu FURUTA[1,2] ([1]Grad. Sch. Eng., Osaka Pref. Univ., [2]Res. Ctr. Microorg. Control, Org. Res. Promot., Osaka Pref. Univ.)

〔目的〕食品や医薬品の製造で適用される殺菌処理においては、抵抗性の細菌芽胞生残のリスクがある。その芽胞は亜致死状態にあり、保存・流通過程で回復する。本研究では、枯草菌の DNA 修復関連遺伝子欠損株を用い、DNA 修復の役割や損傷芽胞の発育動態について二重後培養法[1)]で解析した。〔方法〕*Bacillus subtilis* 168 野生株（WT）および酸可溶性低分子タンパク質：SASP 欠損株（△ *sspAsspB*）、相同組換え修復（HR）欠損株（△*recA* ）、非相同末端結合修復（NHEJ）欠損株（△*ykoUV*）をそれぞれ Schaeffer’s sporulation 寒天培地で芽胞を調製した。UV-C（殺菌灯：波長ピーク 254 nm、0～36 [mJ/cm^2]）処理した芽胞の 0.1%Tween 80 含有 50 mM リン酸カリウム緩衝液（ pH7.0 ）を用いた 10 倍希釈系列を調製し、発育曲線（OD_{650}）による発育遅延解析法[2)] と、スポット法および CFU 法で生存性を比較評価した。〔結果と考察〕UV-C 処理において△ *sspAsspB* と△*recA* では、著しい感受性の増加が確認され、特に△*recA* が最も多く損傷菌が発生した。また、換算生存率（IV）は CFU より低い生存率を示す傾向にあるが、△*recA* のみ、CFU と IV の逆転が見られ、細胞死（増殖死）の発生が示唆された。今後はこの特徴的な細胞死について解析を行う予定である。

Bacterial spores that survive sterilization of food and medical sectors may be sub-lethally injured and recover during post-processing storage. Currently, evaluation methods for these injured spores have not yet been established. In this study, we evaluated the injury characteristics of ultraviolet-C (UV-C)-irradiated spores, focusing on the DNA repair and the subsequent development from spore. Our method development from spore by using the double subculture (DS) method [1)]. Injured population was estimated by differential survival rates between CFU data by plate counts and integrated viability (IV) by the growth delay analysis method[2)] . We applied this DS approach to UV-C-irradiated spores from *Bacillus subtilis* 168 wild-type and its mutants which lacked small acid-soluble protein genes (△*sspAsspB*), homologous recombination repair gene (△*recA*), and non-homologous end binding repair gene (△*ykoUV*). Resultantly, we confirmed the marked increase in susceptibility for the △*sspAsspB* and △*recA* mutants. The △*recA* mutant in particular was the most severely injured. In addition, in most cases CFU values were over the IV values, but only the △*recA* mutant displayed the reverse situation. This result suggests the generation of so-called reproductive death, that is to be further characterized.

1) Tsuchido, T. *Biocontrol Sci.*, **22**, 131-135(2017)
2) Takano, M. and Tsuchido, T. *J. Ferment. Technol.*, **60**, 189-198 (1982)

UV-C, *Bacillus subtilis* spores, injured microorganisms

発表責任者：朝田良子（asada@riast.osakafu-u.ac.jp）

講演番号：3B04-14
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:30～ ミーティングルーム B

枯草菌の発芽レセプター損傷芽胞の解析

Analysis of *Bacillus subtilis* germination receptor system damaged spores

○坂元 仁[1,2]、朝田 良子[2,3]、古田 雅一[2,3]、土戸 哲明[2] ([1]関西大化生工、[2]大阪府立大微制研セ、[3]大阪府立大院工量子)
○Jin Sakamoto[1,2], Ryoko Asada[2,3], Masakazu Furura[2,3], Tetsuaki Tsuchido[2] ([1]Faculty of Chem., Materials and Bioeng., Kansai Univ., [2]Microorganisms Control CRes. Osaka Pref. Univ., [3]Dept. Quantum, Grad. Sch. Eng., Osaka Pref. Univ.)

[目的]枯草菌は飢餓条件下で芽胞という耐久性細胞に分化する。発芽機能の損傷は、見かけ上の死滅と評価されるため、殺菌における微生物制御の評価において無視できない要因であるにも関わらず、これまで考慮されることはなかった。そこで我々は発芽レセプター欠損芽胞を用いて発芽損傷の実態を調査した。
[方法と結果]供試菌として枯草菌 168 株を親株とする発芽レセプター遺伝子およびコルテクッス分解酵素遺伝子の組み合わせた欠損株群を用いた。加熱処理は芽胞にとって非致死的な 85℃ 30min および致死的な 95℃で行った。培地として L 培地および AGFK 発芽誘起物質および 2019 年に新規に見出した発芽物質(坂元ら 日本防菌防黴学会年次大会要旨集 (2019) の添加系でも調査した。*gerA* 欠損株では、未加熱においては、発芽コロニー数が約 1/5 低下したが、非致死的な 85℃処理において、親株および *gerB gerK* 欠損株と同レベルの発芽コロニー数が観察された。一方、95℃で処理では、*gerA* 欠損芽胞において AGFK 含有 L 培地において L 培地よりも高い生存率を示した。我々は正常芽胞と発芽システム欠損芽胞との混合培養系での他力発芽現象を報告している（坂元ら 日本農芸化学会大会要旨集(2019)。現実の殺菌評価は寒天培地でなく液体食品が対象となる。そこで寒天平板とは異なり健常芽胞の発芽因子との接触頻度が高いと予想される液体培地系での生育遅延解析法との比較についても報告する。

Bacillus subtilis differentiates into spores under starvation conditions. Damage to germination function is considered to be apparent death, and although it is a non-negligible factor in bactericidal evaluation, it has not been considered so far. Therefore, we investigated germination damage using germination system-deficient spores, as a parent strain *Bacillus subtilis* 168. In the *gerA* mutant, the number of germinated colonies decreased by about 1/5 when unheated, but the same level of germinated colonies as the parent strain and the *gerB gerK* mutant was observed in the non-lethal 85 ° C treatment. On the other hand, when treated at 95 ° C, *gerA* spores showed higher survival in L-broth containing AGFK than in L-broth. Therefore, we also report a comparison with the growth delay analysis method in a liquid medium system, which is expected to have a high frequency of contact with germination factors of normal spores.

spore, germination, injured microorganism

発表責任者：坂元仁（jin.saka@kansai-u.ac.jp）

講演番号：3B04-15
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:30～ ミーティングルーム B

細菌の糸状成長に必須な鞘形成メカニズムの解明

Elucidation of sheath formation mechanism essential for bacterial filamentous growth

○小野 絵里香[1]、山本 達也[3]、杉本 真也[2]、歌田 アンドリュー シンイチ[3,4]、久能 樹[3]、野村 暢彦[3] ([1]筑波大学生命環境、[2]東京慈恵会医科大学医学、[3]筑波大学生命環境系、[4]筑波大学 MiCS)
○Erika Ono[1], Tatsuya Yamamoto[3], Shinya Sugimoto[2], Andrew shinichi Utada[3,4], Tatsuki Kunoh[3], Nobuhiko Nomura[3] ([1]Tsukuba Univ., Life Environ. Sci., [2]Jikei Univ., Medicine, [3]Tsukuba Univ., Fac. Life Environ. Sci., [4]Tsukuba Univ., MiCS.)

微生物は、水を浄化する手段として広く利用されている。汚水処理施設における活性汚泥法では、好気性微生物叢を用い汚水中の有機物を分解させている。ところが、糸状性細菌の異常増殖は、群集体の形成異常による固液分離障害によって浄水効率を低下させる。そこで、糸状性細菌を排除せず、糸状成長のみを抑制することが求められる。モデル糸状性細菌ある *Leptothrix cholodnii* は、十分に栄養源が存在する環境下で細胞表面から無数の微小繊維を分泌し、それらが折り重なったチューブ状の鞘構造を形成することで糸状成長する。しかし、微小繊維分泌や鞘形成を制御する分子機構の詳細は未解明である。本研究では、菌体周囲の微小環境における栄養源の変化が、これらの制御に与える影響を検討するため、特定成分を欠失した改変培地において *Leptothrix* 細菌の糸状性成長を経時的に顕微鏡観察した。その結果、環境中の炭素、窒素、リン、金属イオンなどの栄養源枯渇で大きく影響を受けることがわかった。例えば、炭素源を制限すると細胞鎖内の細胞間に大きなギャップが生じた。一方、カルシウム源の枯渇では細胞鎖の分断が起こった。さらに、炭素源およびカルシウム源を共に制限することで、細胞増殖は阻害されず 1 細胞レベルまで分断された。現在、異種間接合により栄養源枯渇に応答する遺伝子群の破壊株を作製し、それらの表現型解析に取り組んでいる。

Microorganisms are widely utilized for the treatment of water resources. In activated sludge systems, different kinds of microorganisms are employed to remove contaminants from sewage under aerobic conditions. However, uncontrolled growth of filamentous bacteria interferes with solid-liquid separation due to inhibition of granule formation, resulting in lower quality clarified water. To solve this problem, new control techniques that disrupt filament formation without halting cell growth are required. Filament formation is well-studied in *Leptothrix cholodnii*, a type strain of filamentous bacteria. Under favorable conditions, they divide to generate a cell chain wrapped with a sheath composed of randomly interwoven nanofibrils. However, control of nanofibrils secretion remains unclear. In this study, to investigate nutrient requirement for filamentous growth, we observe filament elongation under various nutrient-depleted conditions. We find dramatic differences when *Leptothrix* cells are transferred to media lacking several nutrients. For instances, carbon source limitation results in appearance of partially empty filaments with wide intercellular gaps, while calcium depletion results in filament fragmentation. Simultaneously limiting carbon and calcium sources stimulates planktonic cell generation. We are now trying to generate and characterize the disruption mutants for genes whose expressions response to nutrient limitations.

filamentous bacterium, nutrient requirement, sheath formation

講演番号：3B04-16
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:30～ ミーティングルーム B

Corynebacterium glutamicum の膜小胞を介した鉄獲得の解析
Membrane vesicles-mediated iron acquisition in *Corynebacterium glutamicum*.
○川島 花雪[1]、永久保 利紀[2]、野村 暢彦[3,4]、豊福 雅典[3,4] ([1]筑波大・生命環境、[2]東京大・農学生命科学、[3]筑波大・生命環境系、[4]筑波大・MiCS)
○ Kayuki KAWASHIMA[1], Toshiki NAGAKUBO[2], Nobuhiko NOMURA[3,4], Masanori TOYOFUKU[3,4] ([1]Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, [2]Univ. Tokyo, [3]Fac. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, [4]MiCS, Univ. Tsukuba)

近年、種々の微生物において生体膜に由来する微小な膜小胞(membrane vesicles, MV)が生産されることが知られている。MV は主に脂質二重膜とタンパク質で構成されており、多くの生物学的機能を持つことが明らかになりつつある。また、それらの機能の潜在能力に着目し、医学や生物工学等の分野への応用を目指す研究も盛んに行われている。MV の生物学的機能に関する理解は、主にグラム陰性菌・グラム陽性菌のモデル生物において進んでおり、宿主動物の免疫撹乱や外部環境からの栄養獲得などにおける役割が示唆されている。一方で、上述の代表的なグラム陰性菌・グラム陽性菌とは大きく異なる細胞表層構造を有するミコール酸含有細菌においては、MV の機能に関する知見が乏しい。そこで、我々は、ミコール酸含有細菌の一つのモデル生物の一種である *Corynebacterium glutamicum* を対象として、本菌の生産する MV の生物学的機能の解明を目指した。

先行研究において、我々は合成培地中で *C. glutamicum* が細胞外に外膜由来 MV を放出することを見出した。さらに、鉄の濃度を制限した合成培地に上記の MV を加えると、鉄制限により低下した *C. glutamicum* の生育が回復することを見出した。この生育回復の効果は、鉄イオンとインキュベートした後に洗浄した MV を用いることで飛躍的に増大した。この結果は、*C. glutamicum* の MV が外部環境からの鉄獲得に関与することを示唆している。加えて、上記の MV について、構造や組成などの諸性質に関与する解析を行った。微生物は外部環境から鉄を獲得するために様々なシステムを獲得してきたが、*C. glutamicum* における鉄獲得のメカニズムに関する知見は乏しい。よって、本研究で得られた結果は *C. glutamicum* において MV を介した未知の鉄獲得経路が存在することを示唆する。本研究の成果は、未解明な点の多いミコール酸含有細菌由来 MV の機能の一端を明らかにするとともに、本細菌群に属する微生物の新たな制御法につながる可能性がある。

Membrane vesicles (MVs), which are mainly composed of lipid bilayers and proteins, are released by bacteria and have diverse biological functions. These functions of have been well understood in Gram-negative and Gram-positive bacteria. However, they remain largely unknown in mycolic acid-containing bacteria that has distinct cell envelope structure including a thick cell wall and outer-membrane (mycomembrane). Our study, suggest that MVs released by *Corynebacterium glutamicum*, are involved in iron acquisition from the external environment. These results will provide new insight into the biological functions of MVs in mycolic acid-containing bacteria.

membrane vesicles, mycolic acids-containing bacteria, iron acquisition

発表責任者：川島 花雪（kawashima.u.tsukuba@gmail.com）

講演番号：3B07-01
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:30～ ミーティングルーム B

コムラサキシメジ菌糸体によるフェアリー化合物産生のための至適培養条件の探索

Optimization of culture conditions for fairy chemicals production by mycelium of *Lepista sordida*

○小堀 一[1]、竹村 太秀[2]、呉 静[3]、多田 有人[1]、河岸 洋和[2,3] ([1]岩出菌学研究所、[2]静大院・創造、[3]静大・グリーン研)
○Hajime KOBORI[1], Hirohide TAKEMURA[2], Jing WU[3], Naoto TADA[1], Hirokazu KAWAGISHI[2,3] ([1]Iwade Research Institute of Mycology CO., Ltd,, [2]Graduate School of Science and Technology, Shizuoka University, [3]Research Institute of Green Science and Technology, Shizuoka University)

【背景・目的】シバなどの植物がリング状に繁茂・枯死する現象、「フェアリーリング現象」の原因物質として、2-azahypoxanthine (AHX) および imidazole-4-carboxamide (ICA) が、コムラサキシメジ菌糸体培養ろ液から単離されている[1,2]。AHX および ICA は、AHX が植物体内で代謝されることにより得られる 2-aza-8-oxohypoxanthine (AOH) とともに、フェアリー化合物 (FCs) と呼称され、AHX と AOH は分類学上の科に関係なく、多くの種類の植物に含まれることが明らかとなっている[3,4]。さらに、FCs は植物成長調節活性を示したことから、その活性の発現機構に関する研究や、農業に応用することを目的としたフィールドレベルでの栽培試験も実施されている[4,5]。

FCs に関する一連の研究を通して、フェアリーリング現象の解明や、その応用に関する検討は化合物レベルでこれまでに行われてきた一方で、FCs 生産菌の菌糸体レベルでは行われておらず、その効率的な培養方法の検討や、大量培養法の確立はされていない。そこで、本研究では FCs 生産菌であるコムラサキシメジ菌糸体を、有機性産業廃棄物を用いて効率的に培養する条件を確立することを目的とした。

【方法・結果】コムラサキシメジ菌糸体をポテトデキストロース寒天培地上で前培養後、有機性産業廃棄物（ふすま、米糠、酒粕またはコーンスティープリカー）を培地原料として含む液体培地にそれぞれ植菌し、振とう培養した。コントロールである YG 培地で振とう培養したものと比較し、菌糸体収量や FCs の産生量を比較した。良好な値を示した有機性産業廃棄物原料を選抜し、その添加量等の条件を検討することにより、至適培養条件を探索した。その結果、コントロールである YG 培地と比較して、短期間に培養が完了し、菌糸体量や FCs 産生量が増加する培養条件を明らかにした。

A fairy-ring-forming fungus, *Lepista sordida*, produces fairy chemicals (FCs)[1-3]. In this study, we clarified optimal culture conditions of *Lepista sordida* mycelia, using food industrial wastes. Under these conditions, weight of the mycelia and production of FCs were increased compared with the conventional culture medium.

1) Choi, J.-H. *et al.*, ChemBioChem., **11**, 1373 (2010).
2) Choi, J.-H. *et al.*, J. Agric. Food Chem., **58**, 9956 (2010).
3) Choi, J.-H. *et al.*, Angew. Chem. Int. Ed., **53**, 1552 (2014).
4) Kawagishi, H., Biosci. Biotechnol. Biochem., **82**, 752 (2018).
5) Kawagishi, H., Proc. Jpn. Acad., Ser. B, **95**, 29 (2019).

cultured mycelium, fairy chemicals, *Lepista sordida*

講演番号：3B07-02
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:30～ ミーティングルーム B

アクチン依存的な核移動による分裂酵母 M 期カタストロフからの回避機構

Actin-dependent nuclear displacement leads to escape from mitotic catastrophe in fission yeast

○湯川 格史[1,2]、登田 隆[1,2] ([1]広島大・院統合生命、[2]広島大・健康長寿研究拠点)
○Masashi YUKAWA[1,2], Takashi TODA[1,2] ([1]Grad. Sch. of Integ. Sci. for Life, Hiroshima Univ., [2]HiHA, Hiroshima Univ.)

細胞増殖及び発生・分化過程を遂行する上で、細胞核が細胞内の特定の空間的位置に配置することは極めて重要である。例えば、酵母有性生殖期では、接合細胞間で二核が近接し、核融合を促進する。出芽酵母 M 期では、核が母細胞から芽（娘細胞）との連結ネック部に移行するが、この核移動は母娘細胞への核（染色体）の分配に必須である。一方、分裂酵母間期では、核は細胞質微小管由来の両端からの相反的押力により平衡的に中央部に維持され、細胞の均等分裂を保証する。

我々は、分裂酵母において M 期遅延・停止に呼応して、F-アクチンが細胞核を非対称的に移動させる現象を見出した。この核移動は、M 期停止からの逸脱が誘起する染色体破断による細胞死（M 期カタストロフ）を回避する細胞生存戦略の一つではないかと考えている。

Proper nuclear positioning is essential for the execution of a wide variety of cellular processes in eukaryotic cells. In proliferating mitotic cells, nuclear positioning is crucial for successful cell division. The bipolar spindle, which pulls sister chromatids towards two opposite poles, needs to assemble in the geometrical center of the cell. This ensures symmetrical positioning of the two nuclei that are reformed upon mitotic exit, by which two daughter cells inherit the identical set of the chromosomes upon cytokinesis. In fission yeast, the nucleus is positioned in the cell center during interphase. By contrast, how the nucleus is positioned during mitosis remains elusive. Here we show that several cell-cycle mutants that arrest in mitosis all displace the nucleus towards one end of the cell axis. Intriguingly, the actin cytoskeleton, not the microtubule counterpart, is responsible for the asymmetric movement of the nucleus. This actin-dependent system may be adopted by which to avoid mitotic catastrophe.

actin, nuclear movement, fission yeast

講演番号：3B07-03
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:30～ ミーティングルーム B

分裂酵母のオキシリピンを介した窒素代謝に関わる細胞間コミュニケーションの解明
Elucidation of the mechanism of intercellular communication by nitrogen signaling factors in *Schizosaccharomyces pombe*

○橋本 莉央[1,2]、八代田 陽子[1]、大澤 晋[1,3]、平井 剛[4]、森山 裕充[2]、吉田 稔[1,5,6]([1]理研 CSRS・ケミカルゲノミクス、[2]東京農工大院・農、[3]Friedrich Miescher Institute for Biomedical Research、[4]九州大院・薬、[5]東大院農・応生工、[6]東大　微生物連携機構)
○Rio HASHIMOTO[1,2], Yoko Yashiroda[1], Shin Ohsawa[1,3], Gou Hirai[4], Hiromitsu Moriyama[2], Minoru Yoshida[1,5,6] ([1]Chem. Genomics Res. Gr., RIKEN, [2]Tokyo Univ. of Agri. & Tech., [3]Friedrich Miescher Institute for Biomedical Research, [4]Fac. Pharm. Sci., Kyushu Univ., [5]Dept. Biotechnol., UTokyo, [6]CRIIM, UTokyo)

分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* は、資化しやすい窒素源と資化しにくい窒素源が存在している環境では、資化しにくい窒素源の取り込みを抑え、積極的に資化しやすい窒素源を取り込んでおり、この機構を「窒素カタボライト抑制」という。ロイシン栄養要求性の *leu1-32* 株は資化しやすい窒素源（アンモニア）が存在すると十分量のロイシンを添加した培地であっても、窒素カタボライト抑制が起こるため生育することができない。しかし、同一培地にて野生型株の近傍で培養すると生育できるという適応生育現象が観察された（Takahashi et al., 2012)。この現象は、野生株と *leu1-32* 株間で何らかの細胞間コミュニケーションがあり、*leu1-32* 株の窒素代謝の変化が起こったことを示す。分裂酵母から分泌される細胞間コミュニケーション分子であるオキシリピン（10(*R*)-hydroxy-8(*Z*)-octadecenoic acid）が、*leu1-32* 株の窒素カタボライト抑制の解除を誘導し適応生育を引き起こすことがわかり、これを Nitrogen signaling factor（NSF）と命名した（Sun et al., 2016)。

本研究では、NSF の関与する適応生育現象を解明することを目的に、関与する遺伝子を網羅的に探索した。*leu1-32* 変異をもつ非必須遺伝子破壊株を作製し、748 mM の塩化アンモニウムと 2 mM のロイシンを含んだ培地において野生型株近傍で適応生育するかどうかを調べた。3228 株のうち 205 株が野生株の近傍で適応生育できなかった。さらに NSF を添加して培養したところ、113 株が適応生育しなかった。Gene Ontology 解析でこれらの遺伝子の傾向を分析すると、呼吸や代謝に関連する遺伝子が多く含まれていた。この結果をもとに NSF に応答し、窒素代謝を制御するための遺伝子ネットワークが解明できれば、分裂酵母の環境中での生存戦略を明らかにできることが期待できる。

A novel cell-cell communication system that regulates nitrogen catabolite repression in fission yeast was discovered. We identified an oxylipin (10(*R*)-hydroxy-8(*Z*)-octadecenoic acid), which we named NSF, as a molecule that restores the growth of *leu1-32* mutant cells defective in leucine uptake in the presence of ammonium chloride. However, it is still unclear how NSF induced the adaptive growth. In order to clarify the mechanism, we constructed gene-disrupted strains (*leu1-32* background), screened for the strains that cannot grow in the proximity of WT cells, and identified candidate genes necessary for the response to NSF. GO analysis showed significant enrichment in respiration and metabolism.

Nitrogen catabolite repression, *Schizosaccharomyces pombe*, Screening

講演番号：3B07-04
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:30～ ミーティングルーム B

トリプトファンの蓄積による細胞壁ストレス応答への影響

Effect of Tryptophan accumulation on cell wall stress response

○大橋 一登 (群馬大生調研)
○kazuto ohashi (Gunma Univ. IMCR)

トリプトファン（Trp）は、生体に欠かせないタンパク質構成アミノ酸の一つである。その一方で、過剰な Trp の蓄積はいくつかの病態と関連することが知られている。これまでに発表者は真核生物のモデル細胞である出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* において、過剰な Trp は細胞増殖を阻害することを見出した。しかし、過剰な Trp が細胞にどのような影響を及ぼすのかはよく分かっていない。

近年、Trp の欠乏によって、出芽酵母が細胞壁ストレスに感受性を示すことが報告され、細胞内の Trp が細胞壁ストレス耐性に重要であることが示唆された。しかし、過剰な Trp が細胞壁ストレスへの応答に必要な Cell Wall Integrity（CWI）経路に及ぼす影響は不明である。本研究では、いくつかの CWI 経路の遺伝子欠損株が過剰な Trp に感受性を示すことを明らかにした。さらに、過剰な Trp 分解に重要な酵素の遺伝子欠損株を用いて、細胞内 Trp の蓄積は細胞壁ストレスへの感受性を引き起こすことを示唆する結果も得られた。以上の結果から、過剰な Trp への応答には CWI 経路が必要であり、細胞内の Trp の蓄積は細胞壁ストレスへの正常なシグナル伝達を妨げる可能性が示唆された。

Tryptophan (Trp) is one of the proteinogenic amino acids indispensable for living organisms. On the other hand, excess Trp accumulation is associated with pathological conditions. So far, we have found that excess Trp inhibits cell growth of budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*, but the mechanism of toxicity due to excess Trp is not elucidated.

In recent years, it has been reported that Trp auxotrophic budding yeast cells are sensitive to cell wall stresses, suggesting that intracellular Trp is important for cell wall stress tolerance. However, the effect of excess Trp on the cell wall stress response has not been clarified. In this study, we found that CWI pathway deficient mutants were sensitive to excess Trp. Also, Trp accumulation in Trp degradation deficient mutant cells lead to cell wall stress sensitive. These results indicate that the CWI pathway is required for response to excess Trp, and that intracellular Trp accumulation may interrupt the normal signal transduction for cell wall stresses.

Tryptophan, Cell wall stress response, Saccharomyces cerevisiae

講演番号：3B07-05
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:30～ ミーティングルーム B

出芽酵母のトランスポーターと予想される寿命延長因子 Ssg1 の機能解析

Analysis of the lifespan extension factore Ssg1 predicted to be a transporter of *Saccharomyces cerevisiae*

○益村 晃司[1]、金井 宗良[2]、河田 美幸[3,4,5]、関藤 孝之[3,4]、曽我 朋義[6]、水沼 正樹[1] ([1]広島大院・統合生命、[2]酒総研、[3]愛媛大院・農、[4]愛媛大・PROS、[5]愛媛大・学術支援、[6]慶應大・先端生命)
○Koji MASUMURA[1], Muneyoshi KANAI[2], Miyuki KAWANO-KAWADA[3,4,5], Takayuki SEKITO[3,4], Tomoyoshi SOGA[6], Masaki MIZUNUMA[1] ([1]Hiroshima Univ. of Integr. Sci. for Life, [2]Natl. Res. Inst. of Brew., [3]Ehime Univ. of Agirc., [4]Ehime Univ. of PROS, [5]Ehime Univ. of ADRES, [6]Keio. Univ of IAB)

メチオニン代謝経路において*S*-アデノシル-L-メチオニン(SAM)はメチオニンとATPから合成され、メチル基供与体としてタンパク質や核酸、リン脂質など様々な物質のメチル化反応に利用される。SAMはメチル基を供与後*S*-アデノシルホモシステイン(SAH)に変換され、SAHはSAMのメチル化反応を競合阻害するためSAH水解酵素*SAH1*によって速やかに分解される。我々の研究室では出芽酵母*SAH1*の変異株(*sah1*)を取得し、*SAH1*の基質であるSAHのみならずSAMの蓄積を観察した。さらに、*sah1*は経時寿命(CLS:定常期後、制限された栄養下での生存日数)において短命であった。

次に新規寿命制御因子取得のため、*sah1*が示す増殖遅延の抑圧を指標にスクリーニングを行った。その結果その抑圧変異*SSG1*を取得した。*SSG1*単独変異株はSAM/SAHの高蓄積に伴いCLSを延長したことから、Ssg1が寿命延長に関わることが予想された。そこで、Ssg1の細胞内の局在を観察したところ、液胞膜に局在していた。これより、Ssg1はSAM/SAHの細胞内の局在に影響することが示唆された。本発表では、SAM/SAHの液胞への輸送・蓄積に関わるSsg1の機能について示す。

In the methionine metabolic pathway, *S*-adenosyl-L-methionine (SAM) as a methyl group donor is synthesized from methionine and ATP. SAM is used for the methylation reaction of various substances such as proteins, nucleic acids and phospholipids. On demethylation, SAM is converted into *S*-adenosylhomocysteine (SAH). SAH is a competitive inhibitor of the methylation reactions by SAM. In a previous study, we have isolated a mutant allele of *Saccharomyces cerevisiae* gene *SAH1* encoding SAH hydrolase. Interestingly, the mutation (*sah1*) led the cells to accumulate SAM besides SAH, the substrate of this hydrolase. Moreover, the *sah1* mutant has a short chronological lifespan (CLS).

To obtain a new regulator of lifespan, we screened for suppression of the *sah1* growth defect. Our genetic screening identified *SSG1* mutation as a suppressor of *sah1*, a mutant in SAH hydrolase involved in the elimination of SAH in yeast. We found that *SSG1* single mutants were shown to have a long CLS concomitant with high accumulation of SAM/SAH, suggesting that the Ssg1 protein might have a role in longevity. Further, we found that Ssg1 localized to the vacuolar membrane in WT cells. Thus, we speculated that Ssg1 might affect the SAM/SAH localization in a cell. We will discuss the function of Ssg1 involved in the transport and accumulation of SAM / SAH into the vacuole.

Yeast, lifespan, methionine metabolism

講演番号：3B07-06
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:30～ ミーティングルーム B

有性生殖誘導に対する黄麹菌 *Aspergillus oryzae* の応答

Response of *Aspergillus oryzae* to induction of sexual reproduction

○峯岸 悠也、丸山 洋平、倉科 瑛衣、加藤 朝子、山形 洋平（農工大院応生化）
○Yuya MINEGISHI, Youhei MARUYAMA, Akie KURASHINA, Asako KATO, Youhei YAMAGATA (Tokyo Univ. of Agriculture and Technology)

黄麹菌 *Aspergillus oryzae* は古くから醤油や味噌、清酒などの製造に用いられてきた。産業的に有用な糸状菌であるが、有性世代が発見されておらず、育種法は限られる。有性生殖の誘導が可能ならば、優れた形質を持つ菌株を交配により作製できるため、広く食品への利用が期待できる。本研究では *A. oryzae* の有性生殖を誘導する条件の確立を目的としている。

MAT 遺伝子は子嚢菌における有性生殖の主制御因子であり、接合型を決める遺伝子である。*MAT1-1*、 *MAT1-2* の 2 つの型が存在し、*A. oryzae* は各菌株がどちらか一方を持つ。

本研究では既に有性世代が発見されている *Aspergillus flavus*、*Aspergillus fumigatus* の有性生殖誘導条件を元に *A. oryzae* の *MAT1-1* 型株、*MAT1-2* 型株の混合培養を行った。その中で、*A. fumigatus* において報告された Vegetative Mass Mating (VeM) 法[1] によって RIB40 株 (*MAT1-1*) RIB143 株 (*MAT1-2*) を混合培養した結果、菌核様構造が得られた。近縁種 *A. flavus* では菌核内部に子嚢果が形成されるため、得られた菌核様構造の内部の観察を解剖により行った。しかし、子嚢果のような構造は見られず、有性生殖に至っていないと考えられた。VeM 法により培養した菌体を用いて qRT-PCR による転写解析を行った結果、*MAT1-1* 依存性のフェロモン関連遺伝子などの遺伝子の転写上昇がみられた一方で、*MAT1-2* 関連遺伝子及び有性生殖後半に働く遺伝子の活性化は見られなかった。以上の結果から *MAT1-2* 型株に問題があるため、有性生殖に至っていないと考えられた。

The filamentous fungus *Aspergillus oryzae* is an industrially important koji mold used for Japanese foods such as sake, soy sauce, and miso. As sexual reproduction has not been observed in *A. oryzae*, the breeding methods available for food production are limited.

In this study, Vegetative Mass Mating (VeM) method[1] was applied to *A. oryzae*. As a result, sclerotia-like structures were obtained, but they had no ascospores. Transcriptional analysis by qRT-PCR analysis revealed that the transcription of *MAT1-1*-dependent pheromone-related genes were up-regulated, whereas those of *MAT1-2*-dependent genes were not. These results indicated that the reason why sexual reproduction has not occurred in *A. oryzae* might be a problem with the *MAT1-2* strain.

1) Lim, J.Y., *et al. J Microbiol.* 57: 688-693 (2019)

Aspergillus oryzae, sexual reproduction, *MAT*

講演番号：3B07-07
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:30～ ミーティングルーム B

Glucuronoyl esterase stimulates biomass degradation by triggering hydrolytic responses in *Neurospora crassa*

○Ruijie WANG[1], Takuya YANO[1], Minoru YOSHIDA[1,2,3], Manabu ARIOKA[1,2] ([1]Dept. Biotechnol., Univ. Tokyo, [2]CRIIM, UTokyo, [3]RIKEN CSRS)

[Background] Glucuronoyl esterase (GE) is regarded as a promising agent for the delignification of plant biomass since it cleaves the ester bond between the 4-*O*-methyl-D-glucuronic acid residue of glucuronoxylan and aromatic alcohol of lignin. In the previous study, we found that *Nc*GE, a GE from *Neurospora crassa*, stimulates plant biomass degradation by xylanase *in vitro*. Interestingly, we also found that overexpression of *Nc*GE *in vivo* elevates the transcription of genes coding for cellulases and hemicellulases when grown on plant biomass. However, the mechanism behind this phenomenon remains elusive.

[Purpose] To elucidate how *Nc*GE stimulates the expression of hydrolytic enzymes (HEs) and degradation of plant biomass, strains deleted for the key transcription factors (TFs), *clr-1*, *clr-2*, and *xlr-1*, were used to examine the gene expression profiles. Also, *Nc*GE- and/or xylanase-treated biomass hydrolysates were applied to the culture of *N. crassa* to investigate their effects on the expression of HEs. Meanwhile, the properties and the cellular localizations of xylanolytic enzymes were studied to better understand the complex biomass degradation system in *N. crassa*.

[Results] Results of qRT-PCR showed that the increased expression of the major HEs upon overexpression of *Nc*GE was abolished by disrupting *clr-1* or *clr-2*. Deletion of *xlr-1* also abolished the expression of xylanolytic enzymes, but not cellulolytic enzymes, by *Nc*GE overexpression. The activity assay of secreted xylanolytic enzymes further confirmed the expression profile of these strains. Besides, by applying the *Nc*GE- and/or xylanase-treated biomass hydrolysates to the culture medium, we found that the major HE genes were highly induced by *Nc*GE- or *Nc*GE plus xylanase-treated biomass hydrolysates, suggesting that the hydrolysates contained substances that are capable of activating the key transcription factors and subsequently triggering the hydrolytic response in *N. crassa*. We further demonstrated that the substances in the hydrolysates with molecular weight larger than 3 kD exhibited a generally stronger induction effect toward the key TFs and HEs in comparison to those smaller than 3 kD. In an independent set of experiments, 6 GH10 and 4 GH11 enzymes were characterized. Of them, GH10-1, GH10-2, GH11-1, and GH11-2 were found to be typical xylanases that play important roles in biomass decomposition *in vivo*. In conclusion, the results indicate that *Nc*GE may act synergistically with the secreted xylanases to release more hypothetical inducer(s) from plant biomass, which then activates the TFs and boosts the production of HEs.

glucuronoyl esterase, biomass, xylanase

発表責任者：Manabu Arioka（arioka@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3B07-08
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:30～ ミーティングルーム B

Cordyceps militaris が産生するコルジセピンのカイコ幼虫へ与える影響

Effects of cordycepin produced by *Cordyceps militaris* on silkworm larvae

○西村 このみ[1]、池尾 一穂[2]、朴 龍洙[3]、加藤 竜也[3] ([1]静大・創科技院、[2]遺伝研・ゲノム進化、[3]静大・グリーン研)

○Konomi NISHIMURA[1], Kazuho IKEO[2], Enoch Y PARK[3], Tatuya KATO[3] ([1]Dept. Agric. Grad. Sch. Integr. Sci. Tech., Shizuoka Univ., [2]Nat. Inst. Genet., [3]Res. Inst. Green Sci. Tech., Shizuoka Univ.)

昆虫病原糸状菌である *Cordyceps militaris* は古くから漢方薬に使用されてきた冬虫夏草の一種である。抗ガン作用を含む様々な薬理活性を持つコルジセピン(3'-デオキシアデノシン)を産生することから注目を集めている。コルジセピンの機能や *C. militaris* 培養による生産に関する研究が数多く行われているが、in vivo におけるコルジセピン産生の生理学的意義は明らかになっていない。本研究ではそのコルジセピン産生の生理学的意義の解明を目的とした。カイコ 5 齢幼虫へコルジセピンの接種を行い、経過時間ごとに観察と解剖を行った。12.5 mM コルジセピンを 100 µl 接種したカイコでは、成長阻害が見られた。また、*C. militaris*、*Beauveria bassiana*、*Metarhizium anisopliae* の分生子 2.5×10^4 個とコルジセピンの共接種により、いずれの菌株においても病斑増加と生存期間短縮が認められた。コルジセピン接種カイコ脂肪体から RNA を抽出し、RNA シーケンシングにより遺伝子発現の変化を調べたところ、コルジセピン接種によってリポプロテインをコードする遺伝子(KWMTBOMO11934)の発現増加と、セリンプロテアーゼインヒビター(セルピン)遺伝子(KWMTBOMO08927)、クチクラタンパク質遺伝子(KWMTBOMO13140, KWMTBOMO13167)の発現減少が確認された。この結果からコルジセピンがカイコ幼虫の成長とクチクラやセルピンを介したカイコの生体防御システムに影響を与えて *C. militaris* の感染や増殖を助長する可能性が示唆された。

Cordyceps militaris, an entomopathogenic fungus, has been used in Chinese herbs for a long time. Cordycepin (3'-deoxyadenosine) is well-known as one of bioactive compounds produced in *C. militaris* and has many bioactivities including anti-cancer activity. Numerous studies have been conducted on the function of cordycepin and the method of culturing *C. militaris* as mycelia, but its roles in vivo during the infection to hosts have not been clarified. The purpose of this study was to investigate the clarification. Growth inhibition of silkworm larvae was observed when 100 µl of 12.5 mM cordycepin was injected to the 5th instar silkworm larvae. In addition, co-injection with *C. militaris*, *Beauveria bassiana*, and *Metarhizium anisopliae* conidia (2.5×10^4) was observed to increase the numbers of lesions and shorten its survival time. RNA was extracted from the cordycepin-injected silkworm fat body, and changes of the gene expression were examined by RNA sequencing. Increased expression of the lipoprotein-encoding gene (KWMTBOMO11934) and decreased expression of serpin protease inhibitor (serpin) gene (KWMTBOMO08927), and cuticle gene (KWMTBOMO13140, KWMTBOMO13167) were confirmed in cordycepin-injected silkworms. These results suggest that cordycepin may affect the growth of silkworm larvae and the cuticle- and serpin-mediated host defense system, leading to the enhancement of *C. militaris* infection.

Cordyceps militaris, Cordycepin, Entomopathogenic fungi

発表責任者：加藤竜也（kato.tatsuya@shizuoka.ac.jp）

講演番号：3B07-09
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:30～ ミーティングルーム B

Streptomyces 属放線菌 Y2944 の セルロース資化に寄与する遺伝子の解析

Expression analysis of the genes responsible for cellulose utilization in *Streptomyces* sp. Y2944

○日比野 竜粛、丸目 浩太郎、牟田口 祐太、小林 正之、小嶋 郁夫、春日 和（秋田県大院生資科）
○Tatsumasa HIBINO, Koutarou MARUME, Yuta MUTAGUCHI, Masayuki KOBAYASHI, Ikuo KOJIMA, Kano KASUGA (Akita Prefectural Univ.)

Streptomyces 属放線菌を利用したセルロース系バイオマス(CB)からの効率の良い物質生産を目指し、セルロースを高度に資化可能な放線菌 *Streptomyces galbus* Y2944 を単離した。ゲノム解読により Y2944 は 10 種のセルラーゼ遺伝子と 2 組のセロビオース（Ceb)資化関連遺伝子クラスターを持つことが分かり、9 種のセルラーゼ遺伝子と Ceb 資化に関連する *cebE1y* の上流に CebR box 配列が見出された。本研究では、Y2944 のセルロース資化能に寄与する遺伝子を明らかにすることを目的として、グルコース（Glc)、Ceb および Avicel (Avi)を主要炭素源とした培養におけるセルラーゼ遺伝子とセロビオース資化関連遺伝子 4 種の発現を RT-PCR により調べた。その結果、CebR box が上流域に存在するセルラーゼ遺伝子 9 種と *cebE1y* の発現は Glc 培養では検出されず、Ceb および Avi の培養で検出された。一方、CebR box が上流に存在しないセルラーゼ遺伝子および 2 つの *cebR* 遺伝子は、すべての炭素源培養で発現が検出された。興味深いことに、Ceb 資化関連遺伝子 *cebE2y* は Glc と Ceb では発現が検出されず Avi でのみ検出された。以上より、Y2944 では、ほとんどのセルラーゼ遺伝子の発現が CebR によって制御されており、効率よくセルロースを分解していると考えられる。

Streptomyces galbus Y2944, capable of highly utilizing cellulose, was isolated. A genome sequencing has revealed that Y2944 has 10 cellulase genes and two cellobiose (Ceb) utilization-related gene clusters, and that the CebR box sequence was found upstream of nine cellulase genes and *cebE1y*, one of Ceb utilization gene. To reveal the genes responsible for the cellulose utilization in Y2944, RT-PCR experiments were performed to examine the expression of the cellulase genes and 4 Ceb utilization-related genes in the cultures grown on glucose (Glc), Ceb, and Avicel (Avi). Expression of nine cellulase genes and *cebE1y* was detected in the cultures with Ceb and Avi, but not with Glc. Meanwhile, the expression of one cellulase gene without CebR box and two *cebR* genes was detected in the cultures on all the carbon sources tested. Interestingly, the expression of *cebE2y* was detected only in Avi but not for Glc or Ceb. These results suggest that the expression of most cellulase genes in Y2944 may be regulated by CebR repressor and thereby the streptomycete could degrade cellulose efficiently.

Streptomyses, cellulase, gene expression

講演番号：3B07-10
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:30～ ミーティングルーム B

出芽酵母ロンボイド Pcp1p の生理機能解明と基質探索

Elucidation of physiological function and substrate search of Saccharomyces cerevisiae rhomboid Pcp1p

○角田 俊揮、日高 將文、小川 智久、新谷 尚弘、二井 勇人（東北大院農）
○Toshiki TSUNODA, Masafumi HIDAKA, Tomohisa OGAWA, Takahiro SHINTANI, Eugene FUTAI (Tohoku Univ.)

【目的】出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* では、膜内切断プロテアーゼとして Pcp1p（Processing of Cytochrome c Peroxidase 1）が同定されている。Pcp1p はミトコンドリア内膜に局在し、Mgm1p（Mitochondrial Genome Maintenance 1）を切断することでミトコンドリア形態や呼吸機能を制御している。しかしながら、Mgm1p の切断片を *pcp1⊿*株に発現させても表現型が完全には相補されないことから、未知の基質が存在すると考えられている。そこで本研究では、*pcp1⊿*株を用いたサプレッサーによる基質探索を行い、Pcp1p の生理機能を解明することを目的とした。
【方法】*pcp1⊿*株は炭素源がグリセロールである YPG 培地において生育ができない。そこで、出芽酵母ゲノム断片を導入した多コピープラスミドライブラリーを *pcp1⊿*株に形質転換し、YPG 培地での生育が回復する株を取得した。次に、これらの株のミトコンドリア形態を蛍光顕微鏡により観察した。また、ミトコンドリア膜画分を取得し、ウエスタンブロット法により Mgm1p の切断を解析した。
【結果】マルチコピーサプレッサーとして、ミトコンドリア内膜に局在する 6 種類のタンパク質の取得に成功した。*PCP1* 欠損によるミトコンドリア形態異常はどのサプレッサー株においても一部相補されたが、Mgm1p の切断異常は回復しなかった。現在は、呼吸能が回復した機構について、Pcp1p の基質候補、並びに酸化的リン酸化（OXPHOS システム）を解析中である。

Pcp1p (Processing of Cytochrome c Peroxidase 1) has been identified as an intramembrane protease in *Saccharomyces cerevisiae*. Pcp1p is localized in the mitochondrial inner membrane and regulates mitochondrial morphology and respiratory function by cleaving Mgm1p (Mitochondrial Genome Maintenance 1). However, expression of a fragment of Mgm1p in *pcp1⊿* does not completely complement the phenotype, suggesting the presence of unknown substrates. The aim of this study is to elucidate the physiological function of Pcp1p by searching for substrates using suppressors of *pcp1⊿*.

Pcp1⊿ cannot grow in YPG medium with nonfermentable carbon source, glycerol. Therefore, we transformed the yeast genomic multicopy plasmid library into *pcp1⊿* and screened for suppressors that grow in YPG medium. Next, we observed the mitochondrial morphology with a fluorescence microscope. We also analyzed cleavage of Mgm1p in mitochondrial fractions by immunoblotting.

As a result, we identified 6 mitochondrial inner membrane proteins as a multicopy suppressor. Mitochondrial morphological abnormalities in *pcp1⊿* were partially recovered in these suppressor strains, but Mgm1p cleavage were not recovered. Currently, we are analyzing the mechanism by which respiratory ability is restored, specifically substrate candidates for Pcp1p and oxidative phosphorylation (OXPHOS) system.

Yeast, Mitochondria, Rhomboid

講演番号：3B07-11
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:30～ ミーティングルーム B

Comamonas testosteroni TA441 におけるフェノール分解遺伝子群の機能解析
Study on physiological function of the phenol degradation genes in *Comamonas testosteroni* TA441
○新北 大樹[1,2]、亀谷 将史[1,2]、石井 正治[1,2]、新井 博之[1,2] ([1]東大院 農生科 応生工、[2]東大微生物連携機構)
○Daiki Shimboku[1,2], Masafumi Kameya[1,2], Masaharu Ishii[1,2], Hiroyuki Arai[1,2] ([1]Dept. Biotechnol., Grad. Sch. Agric. Life Sci., Univ. Tokyo, [2]CRIIM, Univ. Tokyo)

【背景・目的】*Comamonas testosteroni* TA441 はフェノール分解遺伝子を保有するが、その発現はリプレッサー遺伝子により常に抑制されているために、通常の実験室の培養条件下ではフェノールを分解できず生育を示さない。近年、本菌は抑制存在下でも 1-2 mM の低濃度であればフェノールを分解することが分かったが、有意な増殖はみられなかった（大気気相下）。本菌の持つ'cryptic'な遺伝子の生理的意義を理解することは、「微生物の潜在能力の活用」という観点での応用に繋がる。本研究は「発現が抑制されたフェノール分解遺伝子を本菌が保有する意義の解明」を目的とした。
【実験・結果】*C. testosteroni* TA441 のフェノール分解における副反応で酸素から過酸化水素が発生し、生育阻害が起こることを昨年度本大会で発表した。そこで、低酸素条件(3 %)で、1 mM フェノールを唯一の炭素源として培地中濃度が減るたびに 1 mM になるよう添加して培養したところ、増殖が確認された。また、本菌のフェノール分解遺伝子欠損株と野生株を共培養したところ、低酸素、フェノールと他の炭素源の共存在下での培養においてフェノール分解遺伝子を持つ野生株が有利となった。これにより、本菌のフェノール分解遺伝子が低濃度フェノール下で生存に有利に働くことが示された。
【Background & Purpose】*Comamonas testosteroni* TA441 has a complete set of the phenol degradation genes. However, TA441 was unable to degrade and grow on phenol under normal laboratory conditions because phenol degradation genes are constitutively repressed by a repressor. Recently, TA441 was found to degrade phenol without cell growth when it was cultivated on low concentration of phenol (1-2 mM) in the air conditions. The phenol degradation genes of TA441 had been considered to be 'cryptic', but the genes seemed to have a certain physiological function. Therefore, the purpose of this study is to elucidate the biological significance of the genes.
【Method & Result】It was previously shown that hydrogen peroxide is generated from oxygen by shunt reaction of phenol degradation pathway in TA441 indicating that high O_2 condition is not appropriate for TA441 when it grows on phenol. In this study, TA441 was cultivated under low O_2 condition (3 %) with initial concentration of phenol at 1 mM. The cell growth was observed when the culture was supplemented with phenol at 1 mM each time after phenol consumed. When the TA441 and its phenol degrading gene-knockout mutant were co-cultured under low O_2 conditions in the medium containing phenol and other carbon sources, the wild-type strain showed competitive advantage over the mutant strain. These results indicate that the phenol degradation genes have a function for survival of TA441 under natural environments in the presence of phenol.

Comamonas testosteroni, phenol degradation, cryptic gene

講演番号：3B07-12
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:30～ ミーティングルーム B

菌類ウイルスがイネいもち病菌の二次代謝に与える影響

Influence of mycoviruses on secondary metabolism of a rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*

○二宮 章洋[1]、浦山 俊一[1,2]、周防 玲[3]、藤 晋一[4]、森山 裕充[5]、萩原 大祐[1,2] ([1]筑波大生命環境、[2]筑波大 MiCS、[3]日大生物資源、[4]秋田県大生物資源、[5]東農工大農)
○Akihiro NINOMIYA[1], Syun-ichi Urayama[1,2], Rei Suo[3], Shin-ichi Fuji[4], Hiromitsu Moriyama[5], Daisuke Hagiwara[1,2] ([1]Fac. of Life & Env., Univ. of Tsukuba, [2]MiCS, Univ. of Tsukuba, [3]College of Biores. Sci., Nihon Univ., [4]Fac. of Biores. Sci., Akita Pref. Univ., [5]Grad. School of Agric., TUAT)

糸状菌にはウイルスが感染することが知られており，それらは菌類ウイルス（mycovirus）と呼ばれる。菌類ウイルスは宿主を溶菌することなく細胞間を伝わることから，宿主と共生的な関係にあると考えられている。菌類ウイルスは宿主の生理に様々な影響を及ぼすことが古くから知られているが，二次代謝に与える影響は理解が進んでいない。そこで本研究では，菌類ウイルスが糸状菌の二次代謝に与える影響を，イネいもち病菌 *Magnaporthe oryzae* を用いて明らかにすることを目的とした。

本研究では，3 種の菌類ウイルス（トティ，クライソ，パルティティ）に重感染した株（3 重感染株）と，当該株からトティとクライソが失われた株（パルティティ感染株）を用いた。まず，両株の二次代謝プロファイルを比較し，3 重感染株はテヌアゾン酸（TeA）を産生するが，パルティティ感染株は産生しないことを明らかにした。TeA は抗菌，抗ウイルス，および植物毒性等，多様な生物活性を示すカビ毒である。次に，再感染実験によって，物質産生を誘導するウイルスをトティウイルスと同定した。さらに，RT-qPCR とトランスクリプトーム解析によって，ウイルスが転写因子をコードする遺伝子 *TAS2* の活性化を通して TeA の生合成遺伝子 *TAS1* の発現を正に制御することが示唆された。[1]

トランスクリプトーム解析の結果から，ウイルスが *TAS1* を正に制御する一方で，非リボソームペプチド合成酵素とテルペン合成酵素（TS）をコードする遺伝子を負に制御することが示唆された。我々はこれらの遺伝子のうち TS 遺伝子に着目し，その機能を解明することとした。当該 TS 遺伝子を麹菌 *Aspergillus oryzae* に導入したところ，遺伝子導入株は 3 種のカジネン類を産生した。これらカジネンのうち α-カジノールは幅広い真菌に対して活性を示すことが報告されている抗真菌物質である。[2]ウイルスがいもち病菌においてカジネン類の産生を負に制御する可能性が示唆された。

Although mycoviruses cause their hosts to undergo a characteristic change of phenotype, such as colony morphology and mycelial growth, the influences of mycoviruses on secondary metabolism of their hosts are poorly understood. In this study, we demonstrated mycovirus-induced tenuazonic acid (TeA) production in a rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. RT-qPCR and transcriptome analysis indicated the regulatory mechanism underlying induction of TeA production: the totivirus activates the TeA synthetase gene *TAS1* by upregulating the gene encoding a transcription factor *TAS2*.[1] Furthermore, we revealed the function of a terpene synthase (TS) gene, the expression of which is repressed by viral infection.

[1] Ninomiya, A. *et al*. *Front. Microbiol*. **11**, 1641, (2020), [2] Chang, H.-T. *et al*. *Bioresour. Technol*. **99**, 6266−6270, (2008).

rice blast fungus, secondary metabolism, mycovirus

講演番号：3B07-13
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:30～ ミーティングルーム B

白癬菌が産生する抗生物質 viomellein の発見と生合成経路の決定

Identification of antibiotic viomellein produced by dermatophytes and determination of the biosynthetic pathway

○増田 圭恭[1]、二宮 章洋[2]、上野 圭吾[3]、中村 匠[3,4]、清水 公徳[4]、矢口 貴志[5]、浦山 俊一[2,6]、萩原 大祐[2,6]（[1]筑波大院・生命環境、[2]筑波大・生命環境系、[3]感染研・真菌部、[4]理科大・基礎工、[5]千葉大・MMRC、[6]筑波大・MiCS）

○Keisuke Masuda[1], Akihiro Ninomiya[2], Keigo Ueno[3], Takumi Nakamura[3,4], Kiminori Shimizu[4], Takashi Yaguchi[5], Syun-ichi Urayama[2,6], Daisuke Hagiwara[2,6] ([1]Grad. Life Environ. Sci, Univ of Tsukuba., [2]Fac. Life Environ. Sci, Univ of Tsukuba., [3]Dept. Chemotherapy and Mycoses, NIID., [4]Fac. Industrial Sci and Tech, Tokyo univ of Science., [5]MMRC, Chiba Univ., [6]MiCS, Univ of Tsukuba.)

白癬菌は水虫の原因となる病原性糸状菌であり、日本における被感染者数は 2000 万人以上と言われている。白癬菌の感染機構については様々な研究が行われてきたが、感染過程で遭遇すると考えられる皮膚常在菌との相互作用に関する知見はほとんど得られていない。白癬菌はゲノム中に二次代謝産物の生合成遺伝子クラスターを多数有する事が知られており、それらの産物は他の微生物との競合に関与する可能性がある。そこで、本研究では白癬菌を対象に、他の微生物との競合に関わる抗菌物質を探索した。

初めに、5 種の白癬菌から得られた培養抽出物を抗菌活性試験に供したところ、4 種の抽出物が抗グラム陽性細菌活性を示すことを見出した。活性を示した *Trichophyton rubrum* の培養抽出物から活性成分を単離した後、LCMS 分析によって当該物質を viomellein と同定した。Viomellein は赤色色素化合物であり、*Aspergillus* 属および *Penicillium* 属菌による産生が報告されている。次に、トランスクリプトーム解析を行い、ポリケチド合成酵素（PKS）遺伝子を含む遺伝子クラスターを viomellein の生合成遺伝子クラスターと推定した。当該クラスターに含まれる遺伝子のうち、PKS 遺伝子を含む 7 遺伝子を麹菌 *Aspergillus oryzae* に導入したところ、遺伝子導入株が viomellein を産生したため、当該クラスターを viomellein の生合成遺伝子クラスター（vio クラスター）と同定した。さらに、当該異種発現系を用いて viomellein の生合成経路を推定した。

Dermatophytes are pathogenic fungi causing athlete's foot, and the number of infected people in Japan is estimated at more than 20 million. Although the mechanisms of their infection have been partly analyzed, knowledge about the interaction between dermatophytes and skin microbiota is poor. There are a large number of genes for secondary metabolism in the genome of the dermatophytes, which implies that their products are involved in the competition with other microbes. In this study, we searched several dermatophyte species for antibacterial compounds.

We evaluated the antimicrobial activity of the culture extracts from five dermatophyte species, and found that the extracts from four species showed activity against gram-positive bacteria. The antibacterial compound was identified as viomellein by LCMS analysis. To identify the gene cluster for viomellein biosynthesis, we performed transcriptome analysis. As a result, a gene cluster including a polyketide synthase (PKS) gene, named *vio* cluster, was identified as a candidate for the viomellein biosynthetic gene cluster. By heterologous expression of the biosynthetic genes encoded in *vio* cluster in *Aspergillus oryzae*, we determined *vio* cluster as the biosynthetic gene cluster for viomellein.

Trichophyton, secondary metabolism, heterologous expression

発表責任者：萩原大祐（s1921164@s.tsukuba.ac.jp）

講演番号：3B07-14
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:30～ ミーティングルーム B

糸状菌 *Aspergillus niger* における共培養誘導型の黄色色素生産とその生合成遺伝子の決定

Production of yellow pigment and identification of biosynthetic genes in *Aspergillus niger* by a fungal-fungal co-culture

○辻 晴佳[1]、二宮 章洋[2]、竹下 典男[2,4]、甲斐 建次[3]、浦山 俊一[2,4]、萩原 大祐[2,4]（[1]筑波大院・生命環境、[2]筑波大・生命環境系、[3]阪府大・生命環境、[4]筑波大・MiCS）

○ Haruka TSUJI[1], Akihiro NINOMIYA[2], Norio TAKESHITA[2,4], Kenji KAI[3], Syun-ichi URAYAMA[2,4], Daisuke HAGIWARA[2,4] ([1]Grad. Sch. of Life and Env., Univ. of Tsukuba, [2]Fac. of Life and Env., Univ. of Tsukuba, [3]Grad. Sch. of Life and Env., Osaka Pref. Univ., [4]MiCS, Univ. of Tsukuba)

【背景・目的】糸状菌には通常の培養条件では発現しない休眠二次代謝遺伝子が多数存在し、新規有用化合物の探索源として注目を集めている。休眠遺伝子を活性化させる手法の一つとして、生物間相互作用を利用した共培養が用いられているが、その分子機構は不明な点が多い。そこで本研究では複数の *Aspergillus* 属糸状菌を対象に、共培養特異的な二次代謝の探索および産生誘導する生合成遺伝子の同定を試みた。

【方法・結果】探索の結果、*A. niger* が他の *Aspergillus* 属糸状菌との共培養により、培養初期に黄色色素化合物 X を産生することを発見した。さらに LC-MS 解析から、化合物 X の質量電荷比を *m/z* 473.3 と推定することができた。イメージング MS を用いて対峙培養時の化合物 X の局在を可視化すると、*A. niger* の対峙面から強いシグナルが検出された。続いて RNA-seq 解析によって、PKS-NRPS と NRPS から構成される共培養特異的に活性化する *A. niger* 二次代謝遺伝子クラスターを見出した。CRISPR/Cas9 システムにより上記の候補遺伝子を破壊すると、破壊株では共培養時に化合物 X を産生しなくなったことから、化合物 X の生合成遺伝子クラスターであると同定した。また、比較ゲノム解析から、本クラスターが複数の近縁種（*Aspergillus neoniger, Aspergillus phoenicis* など）にも保存されていることが判明した。興味深いことに、これらの菌種においても共培養により化合物Xの産生誘導が確認され、応答機構も保存されていると考えられた。

To explore unstudied fungal silent secondary metabolites (SMs), co-culturing with other microorganisms is a promising way. Although several novel compounds have been identified by fungal co-culture, the molecular mechanisms underlying the induction of SM production are unclear. In the present study, we investigated SM production induced by a co-culture between different *Aspergillus* species.

We found specific yellow pigment production by co-culture with the combination of *A. niger* and other *Aspergillus* species. Imaging mass microscope visualized strong signal of the target compound X (*m/z* 473.3) on interface of the colonies. From RNA-seq analysis, the biosynthetic gene cluster (BGC) of compound X was estimated to be a cluster of PKS-NRPS and NRPS. We constructed knockout mutants for the genes, and the mutant strains didn’t produce compound X by co-culture. From the result, this cluster was identified to be a BGC for compound X. Interestingly, this gene cluster was conserved in multiple related species, and some species showed production of compound X induced by co-culture with *Aspergillus* species.

fungal-fungal co-culture, *Aspergillus niger*, secondary metabolite

発表責任者：萩原大祐（hagiwara.daisuke.gb@u.tsukuba.ac.jp）

講演番号：3B07-15
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:30～ ミーティングルーム B

天然由来抗菌物質による *Penicillium* 属菌二次代謝の覚醒とその解析

Secondary metabolism aroused by natural antibiotics in *Penicillium* spp.

○波形 匠[1]、老木 紗予子[2]、二宮 章洋[2]、矢口 貴志[3]、浦山 俊一[2,4]、萩原 大祐[2,4]([1]筑波大院・生命地球、[2]筑波大・生命環境、[3]千葉大・MMRC、[4]筑波大・MiCS)
○Takumi NAMIKATA[1], Sayoko OIKI[2], Akihiro NINOMIYA[2], Takashi YAGUCHI[3], Syun-ichi URAYAMA[2,4], Daisuke HAGIWARA[2,4] ([1]Deg. Prog. in Life & Earth Sci., Univ. of Tsukuba, [2]Fac. of Life & Env. Sci., Univ. of Tsukuba, [3]MMRC, Chiba Univ., [4]MiCS, Univ. of Tsukuba)

【緒言】糸状菌が持つ遺伝子の大部分は通常の実験室環境で発現しない休眠遺伝子であり、これらの発現が可能になれば有用な新規化合物の取得が見込まれる。そこで本研究では化学応答が盛んな自然環境中での生物間の相互作用に着目した。柑橘類の精油成分である farnesol(FOH)、植物ホルモンの salicylic acid(SA)、*Pseudomonas*属菌が産生する pyocyanin(PYO)の 3 種の抗菌物質を培地に添加し、多様な二次代謝遺伝子を有する 12 種 84 株の *Penicillium* 属菌を対象として、体系的に休眠遺伝子の覚醒を検討した。
【結果】PDB 液体培養の抽出試料を HPLC 分析した結果、各種抗菌剤により新規に現れた平均ピーク数は FOH（n=84）で 1.64 本、SA(n=84)で 1.73 本であった。また FOH、SA 処理の培養抽出液の *Bacillus subtilis* に対する抗菌活性を調べると、いずれも 6 株の試料で活性が出現した。このうち比較的活性の強い *Penicillium oxalicum* の FOH 添加培養の抽出液は、ペニシリン分解酵素の有無によらず活性を示したことから、ペニシリン以外の抗菌物質を産生していると推測された。バナナ表面に滴下し傷害活性を指標にした抗植物活性試験では、FOH、SA 処理により、それぞれ 7、42 株が新たに活性を示した。また、PYO を添加した場合、HPLC チャートの新規ピーク数の平均は 17.4(n=12)と大きく変化し、著しい代謝の変化が起こることが示唆された。これらの結果から、生物間の化学応答の利用により、糸状菌の休眠二次代謝を活性化させ、新たな化合物の取得が可能になると期待される。

Most of secondary metabolite genes of filamentous fungi are silent in laboratory conditions. To test if the fungal silent secondary metabolisms are waken by addition of natural antibiotics, we used farnesol (FOH), an essential oil of citrus fruits, salicylic acid (SA), a plant hormone, and pyocyanin (PYO) produced by *Pseuodomonas* spp. against 84 strains of *Penicillium* spp. When FOH or SA were added to the culture, HPLC analysis revealed that new peaks were appeared in the culture extract of 60 or 62 strains, respectively. The 6 of FOH-treated culture extracts showed antibacterial activity against *B. subtilis*, whereas the SA-treated ones of 45 strains showed inhibitory activity to banana surface. When PYO was added (n=12), the mean numbers of newly appeared peaks on HPLC charts was 17.4, suggesting that significant metabolic changes were occurred. These results suggest that filamentous fungi in a natural environment, their secondary metabolism can be activated by chemical interaction with other organisms.

secondary metabolism, natural antifungal, salicylic acid

発表責任者：萩原 大祐（hagiwara.daisuke.gb@u.tsukuba.ac.jp）

講演番号：3B07-16
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:30～ ミーティングルーム B

Saccharomyces cerevisiae によるテルペンアルコールからのゲラン酸とシトロネル酸の生合成

Biosyntheses of geranic acid and citronellic acid from terpene alcohols by *Saccharomyces cerevisiae*

○大橋 勇敢、前田 勇（宇都宮大農）
○Yuka OHASHI, Isamu MAEDA (Utsunomiya Univ.)

アルコール飲料において重要視されている香気成分としてテルペノイドが挙げられる。その中でもゲラニオールが主な出発物質とされており、発酵過程において種々のテルペノイドに転換される。また転換に関与する酵素遺伝子がいくつか報告されており、出芽酵母ではゲラニオールから酢酸テルピニルへの転換には *ATF1* 遺伝子が、ゲラニオールからシトロネロールの転換は *OYE2* 遺伝子がそれぞれ関与することが明らかとなっている。しかしながら、これら以外の転換過程に関与する遺伝子はこれまで明らかにされていない。本研究では、*Saccharomyces cerevisiae* における酵素の触媒下でテルペノイドの他の変換が行われているかどうかを明らかにすることを目的とした。

出芽酵母は、実験用株として *S. cerevisiae* BY4741 とそのアルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子欠損株（Euroscarf）を用いた。グルコースを炭素源とした最少培地に各テルペノイドを添加し 20℃で 10 日間の培養を行った。培養液からジクロロメタンで代謝産物を抽出し GC-MS による分析を行った。

酵母培養開始時に基質としてゲラニオールを添加した培養液から、これまでに報告のあるシトロネロールとリナロールに加えて、ゲラン酸とシトロネル酸が検出された。ゲラニオールからの中間代謝物と考えられる各テルペノイドからのゲラン酸とシトロネル酸の生成量の結果より、ゲラン酸はゲラニオールとネロールの酸化物であるシトラールから変換され、シトロネル酸はシトロネラールから変換されることが示唆された。そして、アルコール脱水素酵素をコードする遺伝子、*ADH1*、*ADH3*、*ADH4*、または *SFA1* を欠失させると、ゲラン酸およびシトロネル酸の産生およびゲラニオールの消費に影響を与えた。

Terpenoids form a group of the important aromatic ingredients in alcoholic beverages. Among them, geraniol is considered to be the main starting material and is converted to various terpenoids during the fermentation process. We have studied the bioconversion process and the genes involved in the oxidation of geraniol in the fermentation medium. Geranic acid and citronellic acid, in addition to previously reported citronellol and linalool, were detected in yeast culture. It was suggested that geranic acid and citronellic acid could be converted from citral and citronellal, which are oxidation products of geraniol and nerol, respectively. Deletion of a gene encoding alcohol dehydrogenase, *ADH1*, *ADH3*, *ADH4*, or *SFA1* affected production of geranic acid and citronellic acid and consumption of geraniol. This is the first report of the bioconversion of geranic acid and citronellic acid from terpene alcohols, geraniol and nerol, in yeast culture.

Saccharomyces cerevisiae, Geranic acid, Citronellic acid

発表責任者：前田　勇（i-maeda@cc.utsunomiya-u.ac.jp）

講演番号：3B07-17
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:30～ ミーティングルーム B

酵母 *Pichia pastoris* を宿主とした有用芳香族化合物生産プロセスの開発

Development of aromatic compounds production process using yeast *Pichia pastoris*

○雲北 涼太、番場 崇弘、蓮沼 誠久、近藤 昭彦（神戸大）
○Ryota KUMOKITA, Takahiro BAMBA, Tomohisa HASUNUMA, Akihiko KONDO (Kobe Univ.)

植物二次代謝物の中でも、チロシンなどの芳香族アミノ酸から生産できる、ベンジルイソキノリンアルカロイド（BIAs）やフラボノイド、スチルベノイドには生理活性をもつ化合物が多く、主に医薬品として用いられている。現在は、その生産を植物からの抽出に依存しているが、近年、植物に比べ生育が早く、限られた敷地でも生産可能な微生物を用いた発酵生産法の確立が望まれている。

微生物宿主として、これまで大腸菌 *Escherichia coli* や酵母 *Saccharomyces cerevisiae* が用いられてきたが、大腸菌は pH やウイルス汚染、生産化合物の毒性による影響を受けやすい。一方、酵母はこれらの影響を受けにくいが、*S. cerevisiae* ではエタノールの生産を阻害して芳香族化合物を高収率で生産することが難しい。そこで、本研究では酵母 *Pichia pastoris* に着目した。*P. pastoris* は好気条件ではエタノールを生産しない他、*S. cerevisiae* に比べ細胞増殖能にも優れている。更にメタボローム解析結果から、芳香族生産に適した代謝機構を有していると考えられる。しかしながら、*P. pastoris* を宿主に芳香族化合物を生産した報告はほとんど無い。本研究では、*P. pastoris* を宿主に芳香族化合物高生産に有効な酵素・基質の探索を行った。その結果、シキミ酸経路の ARO4 と ARO7 にフイードバック阻害を解除する変異を導入して過剰発現させることで芳香族化合物生産能を向上させることに成功し、*P. pastoris* の芳香族化合物生産能が高いことも示唆された。

Aromatic compounds derived from aromatic amino acid such as benzylisoquinoline alkaloids (BIAs), flavonoids and stilbenoids are plant-derived secondary metabolites that include the pharmaceuticals. Currently, these aromatic compounds are mainly produced by extraction from plants. However, extractions methods from plants are hampered by costly and inefficient. Therefore, it is desired to establish a fermentation production method using microorganisms, which grows faster than plants and can be produced on a limited site.

In this study, we tried to produce aromatic compounds using non-conventional yeast *Pichia pastoris*. *P. pastoris* is attracted attention as a host for production of aromatic compounds because *P. pastoris* does not produce ethanol under aerobic conditions, and it is superior to conventional yeast *S. cerevisiae* in cell growth. Furthermore, metabolomic analysis data suggested that *P. pastoris* is suitable for the production of aromatic compounds.

Pichia pastoris, metabolic engineering, aromatic compounds

発表責任者：雲北涼太（195p006p@stu.kobe-u.ac.jp）

講演番号：3C01-01
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:00～ ミーティングルーム C

普遍的リボヌクレアーゼ RNase T2 のリボソームによる活性制御機構の解析
Regulation mechanism of the enzymatic activity of conserved ribonuclease, RNase T2, by ribosomes
○南 篤[1]、日高 真誠[1]、葛山 智久[1,2]、小川 哲弘[1,2]（[1]東大院・農生科、[2]東大・微生物連携機構）
○Atsushi MINAMI[1], Makoto HIDAKA[1], Tomohisa KUZUYAMA[1,2], Tetsuhiro OGAWA[1,2] ([1]GSALS., UTokyo, [2]CRIIM, UTokyo)

【背景・目的】RNase T2 は、ほぼ全ての生物種に普遍的に存在するリボヌクレアーゼである。一本鎖 RNA を非特異的に分解するという極めて単純な酵素活性でありながら、生物種に固有の多様かつ重要な生命現象に関与している。一方でバクテリアでの役割は不明であったが、2018 年に、大腸菌において RNase T2（大腸菌では RNase I と呼ばれる）がバイオフィルム形成を抑制することが報告された (Fontaine *et al,* 2018)。これに基づくと、バイオフィルム形成時には RNase I の活性が阻害される必要がある。これまで、RNase I が宿主リボソームにより特異的に阻害されること、またリボソームがバイオフィルム形成条件下で構造変化を介して不活性化することが知られている。以上を踏まえ、我々は、この不活性化リボソームが RNase I を阻害すると考え、この仮説の実証を目指した。

【方法・結果】我々は、昨年、不活性型リボソーム蓄積株がアミノ酸飢餓条件下で高いバイオフィルム形成能を示すことを報告した（南ら、日本農芸化学会 2020 年度大会）。そこで、これらの株における RNA 分解の程度を調べた。その結果、これら不活性型リボソーム蓄積株では、野生株と比べて RNA 分解の程度が抑制された。さらに、試験管内で RNase I に調製した不活性化リボソームを作用させた後、RNA 分解活性を調べた。その結果、不活性化リボソームによる RNase I の阻害が観察された。

RNase T2 is a conserved ribonuclease found among most of organisms. Although enzymatic activity, cleaving single-stranded RNA nonspecifically, is quite simple, RNase T2 is involved in diverse and important biological events in each organism. However, the role of RNase T2 in bacteria has been unclear. Recently, it was reported that RNase T2 (called RNase I in *Escherichia coli*) regulates biofilm formation. In the regulation process, 2′,3′-cyclic mononucleotides, generated by RNase I-catalyzed degradation of host RNAs, serves as a second messenger to suppress biofilm formation (Fontaine *et al*, 2018). Therefore, it was expected that the activity of RNase I is inhibited in the stress condition. It is known that the activity of RNase I is inhibited by ribosomes. In addition, ribosomes change their structure in the stress condition. Therefore, we hypothesized that the inhibition of RNase I depends on the structural change of ribosomes. Here, we will discuss the molecular mechanism of biofilm formation via ribosome-dependent regulation of RNase I activity in *E. coli*.

RNA degradation, Biofilm, *Escherichia coli*

発表責任者：小川　哲弘（atetsu@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3C01-02
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:00～ ミーティングルーム C

大腸菌における DNA 障害後の SulA 依存性溶菌機構の主要経路

The main cascade of SulA-dependent cell lysis after DNA damage in *Escherichia coli*

○大田 菜都子[1]、大澤 歩[1]、高坂 智之[1,2]、村田 正之[1]、中村 慶子[3]、室 龍之介[3]、山田 守[1,2,3]（[1]山口大院創科、[2]山口大中高温微研セ、[3]山口大院医）
○Natsuko Ota[1], Ayumi Osawa[1], Tomoyuki Kosaka[1,2], Masayuki Murata[1], Keiko Nakamura[3], Ryunosuke Muro[3], Mamoru Yamada[1,2,3] ([1]Grad. Sch. of Sci. and Tech. for Inno, Yamaguchi Univ., [2]Res. Cen. for TMR, Yamaguchi Univ., [3]Grad. Sch. of Med, Yamaguchi Univ.)

DNA 損傷は生物にとって有害であり、その程度に応じて修復か細胞死による除去が選択されている。大腸菌においても高等真核生物の DNA 障害における p53 と同様な役割を担う因子が存在する可能があり、我々は、SOS 応答遺伝子産物の 1 つである SulA に着目している。DNA 損傷が起ると SOS 応答の 1 つとして SulA が発現し、細胞分裂を阻害することによって DNA 修復の時間を確保する。しかし、DNA 損傷が深刻な場合については不明である。そこで、SulA を高発現させたところ溶菌が観察された。さらに、この SulA 依存性溶菌 (SDCL) 機構を調べるために転写解析を行い、SulA 過剰発現時に転写誘導が見られた *soxS* に着目した。*soxS* 破壊株における SDCL を観察したところ、溶菌が明確に抑制されたことから、SoxS が SDCL において重要な役割を担っていることが示唆された。続いて、SoxS 制御下にあると考えられている 19 遺伝子の内で SDCL に関与する遺伝子の探索を試みたところ、必須遺伝子で LPS の合成に関与する *lpxC* を過剰発現させた株で顕著な溶菌が観察された。加えて、LpxC 阻害剤である CHIR090 を用いて *sulA* および *soxS* それぞれの過剰発現株における溶菌を比較したところ、阻害剤の濃度上昇に伴って溶菌の減少が観察された。このことから、SDCL の主要経路が SulA→SoxS→LpxC であると推察した。

DNA damage is harmful to living organisms, and repair or removal by cell death is selected depending on the degree. It is assumed that *Escherichia coli* has a factor(s) functionally similar to p53 in higher eukaryotic cells to respond to DNA damage. As a candidate of the factor, we focused on SulA, one of the SOS response genes and found cell lysis when *sulA* was overexpressed. The SulA-dependent cell lysis (SDCL) was further examined by transcriptome analysis, showing that *soxS* was up-regulated by *sulA*-overexpression. Since the *sulA* disruption suppressed SDCL, the involvement of 19 SoxS regulon genes in SDCL was examined. As a result, an *lpxC*-overexpressed strain exhibited remarkable cell lysis. In addition, an LpxC inhibitor CHIR090 showed the repression of SDCL with increased concentration. These results suggest that LpxC, which is an essential gene product related to the synthesis of lipopolysaccharide, is involved in SDCL, downstream from SoxS. It is implied that the main cascade of SDCL is lined up in the order of SulA, SoxS, and LpxC.

SOS response gene, cell lysis, *Escherichia coli*

発表責任者：山田守（m-yamada@yamaguchi-u.ac.jp）

講演番号：3C01-03
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:00～ ミーティングルーム C

細菌細胞内 pH モニタリングシステムを利用した大腸菌長期定常期のリアルタイム細胞内 pH 測定
Real-time intracellular pH measurement of Escherichia coli in the long-term stationary phase using a bacterial intracellular pH monitoring system

○臼田 隆亮[1]、須藤 雅己[2]、蓮池 祐紀[3]、深田 悠太[2]、片岡 正和[2]([1]信州大工、[2]信州大院　総合理工　生命医工、[3]信州大工　物質化学)
○RYUSUKE USUDA[1], MASAKI SUTO[2], YUKI HASUIKE[3], YUTA FUKADA[2], MASAKAZU KATAOKA[2] ([1]Fac. Eng., Shinshu Univ., [2]Dep. Bioeng., Grad. Sch. Sci. tech., Shinshu Univ., [3]Dep. Mat. Chem., Fac. Eng., Shinshu Univ.)

細胞内 pH は細胞培養や酵素反応を伴う生体プロセスにおいて、基本的ながら非常に重要なパラメータである。特に細胞内 pH 値の時間的変化を測定する試みは重要とされ、今日では、pH 感受性の蛍光色素を用いた方法が考案されているが、侵襲性や試薬の漏出があるために、生きたまま pH 値の時間的変化を測定することが不可能である。

我々は、細菌内での pH 変化を生きた状態のままリアルタイムに測定できる系の確立を目的として、2 種類の蛍光タンパク質（pHuji 及び GFPuv）を組み合わせて発現させた大腸菌を 37℃で 10 日間長期培養した際の、1 日ごとの細胞内 pH と外部 pH の値を測定した。細胞内 pH は培養開始後 pH7. 0 周辺だったが、対数増殖期と定常期の間で上昇しアルカリ側へシフトする結果を得た。また細胞内 pH の変動は、培養開始後 72 時間以降の長期定常期で外部 pH の値に同調したことから、生育阻害の起こらない幅広いタイムスケールでの pH 値の時間的変化を測定できたと考えている。

本発表では、上記の研究とともに、現在取り組んでいる蛍光顕微鏡を用いた 1 細胞ごとの細胞内 pH の測定についても紹介する。

Intracellular pH (pH_{int}) is a basic and very important parameter in biological processes involving cell culture and enzymatic reactions. Attempts to measure the temporal change in pH_{int} are important, and today, methods using pH-sensitive fluorescent dyes have been applied, but it is impossible to measure real-time changes of pH_{int} in living conditions due to invasiveness and reagent leakage.

In order to establish the system that allows real-time measurement of pH_{int} changes in bacteria, we measured daily pH_{int} and external pH (pH_{ext}) *Eschericia coli* culture expressing with a combination of two fluorescent proteins (pHuji and GFPuv) during long-term incubation at 37°C for 10 days. The pH_{int} was around pH 7.0 after the start of culture, but it increased from the exponential phase to the stationary phases and shifted to the alkaline side. In addition, pH_{int} approached pH_{ext} value culture for 72 hours (long-term stationary phase), suggesting that we were able to measure the temporal change in pH_{int} over a wide range of timescales without growth inhibition.

In this presentation, we will present our current work on the measurement of pH_{int} of individual cell using fluorescence microscopy as well as the above studies.

Intracellular pH, Fluorescent proteins, Long-term stationary phase

発表責任者：臼田 隆亮（ryuusuke_u@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：3C01-04
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:00～ ミーティングルーム C

細菌細胞内 pH モニタリングシステムを利用した大腸菌細胞内 pH 調節機構の解明

Elucidation of the mechanism of intracellular pH regulation in *E. coli* by "The Intracellular pH Monitoring System"

○須藤 雅己[1]、臼田 隆亮[2]、蓮池 祐紀[3]、片岡 正和[1] ([1]信州大・生命医工、[2]信州大・工・技、[3]信州大・物質化)
○Masaki Sutou[1], Ryousuke Usuda[2], Yuuki Hasuike[3], Masakazu Kataoka[1] ([1]Dept. Bio Eng. Gra. Sch. Shinshu Univ., [2]Engineer, Shinshu Univ., [3]Dept. Eng. Shinshu Univ.)

細胞内 pH が一定の範囲に保たれていることは、細胞内の諸反応に大きく影響している。この恒常性は pH ホメオスタシスと呼ばれ、細胞機能が円滑に働くためには、細胞内 pH の調節が不可欠である。今日までの研究から大腸菌の pH 調節機構は細胞内が酸性化した際の知見は多く集積されている。しかし細胞内がアルカリ化した際の調節機構に関しては、Na^+/H^+アンチポーターによって調節が行われていると考えられているものの、その詳細は明らかになっていない。そこで本研究では当研究室で開発した蛍光タンパク質を利用した細胞内 pH 測定法である「細胞内 pH モニタリングシステム」を用いて、大腸菌 pH 調節機構の解明を目指した。

膜でのイオン輸送に大きく関与する Na^+と K^+に着目し、細胞内外におけるイオン環境の変化、並びに外部 pH の変化による細胞内 pH の変化についてリアルタイムで測定を行った。本結果から、我々の知る範囲では明らかになっていない K^+を介した細胞内 pH 調節機構が存在することが示唆された。さらに大腸菌は異なる複数の細胞内 pH 適応範囲を保持していることも明らかになった。

Maintaining intracellular pH(pH_{int}) within a certain range takes a significant impact on intracellular reactions. This pH range keeping is called pH homeostasis, and the regulation of pH_{int} is essential for the normal cellular function. From the research to date, we have accumulated a lot of knowledge on the regulation of pH_{int} in *E. coli* when the intracellular environment becomes acidic. However, the regulation of intracellular alkalinization has not been clarified, although it is thought that Na^+/H^+ antiporters are responsible for the regulation. In this study, we aimed to elucidate pH_{int} regulation mechanism of *E. coli* by using “The Intracellular pH Monitoring System”, using fluorescent proteins developed in our laboratory.

We focused on Na^+ and K^+, which take a major role in membrane, and measured real-time changes in pH_{int} according to the ionic environmental alteration. Our results suggest that there is a K^+-mediated pH_{int} regulatior that has not been clarified to the best of our knowledge. Furthermore, *E. coli* is considered to maintain multiple different intracellular pH adaptation ranges.

pH dynamics, Bacteria, Fluorescent protein

発表責任者：須藤雅己（20bs109h@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：3C01-05
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:00～ ミーティングルーム C

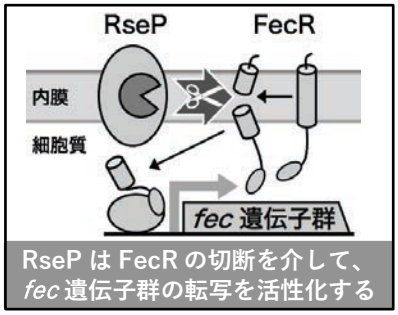
大腸菌膜内切断プロテアーゼ RseP の新奇生理機能：FecR の切断を介した鉄取り込みに関わる遺伝子群の転写活性化

A novel physiological function of RseP, an *E. coli* intramembrane protease: Transcriptional activation of genes involved in iron uptake through the cleavage of FecR.

○横山 達彦[1]、新苗 智也[2]、津曲 和哉[2]、今見 考志[2]、石濱 泰[2]、檜作 洋平[1]、秋山 芳展[1]([1]京大ウイルス・再生研、[2]京大院薬)
○Tatsuhiko YOKOYAMA[1], Tomoya NIINAE[2], Kazuya TSUMAGARI[2], Koshi IMAMI[2], Yasushi ISHIHAMA[2], Yohei HIZUKURI[1], Yoshinori AKIYAMA[1] ([1]Inst. Front. Life Med. Sci., Kyoto Univ., [2]Grad. Sch. Pharm. Sci., Kyoto Univ.)

大腸菌が持つ膜内切断プロテアーゼの一つ RseP は、表層ストレス応答に関与する転写制御因子 σ^E の活性化やシグナルペプチドの分解を担う。RseP はこれら以外にも未知の生理機能を有することが示唆されてきたが不明であった。そこで本研究では、RseP の新たな生理基質・機能の同定を目的とした。

野生型及び活性変異型の RseP を過剰発現した細胞の膜画分からタンパク質を抽出し、定量プロテオーム解析によってその蓄積量を比較した。その結果、鉄クエン酸錯体の細胞内への取り込みに関わる Fec システムを構成するタンパク質群の蓄積量が、RseP 機能不全により低下することを見出した。これを元に、RseP が Fec システム因子をコードする *fec* 遺伝子群の転写活性化に必須であることを明らかにした。さらに、*fec* 遺伝子群の転写を調節する TypeII 一回膜貫通タンパク質 FecR に注目し、FecR とそのモデル基質を用いた解析から、RseP が FecR を切断すること、その切断断片が *fec* 遺伝子群の転写を誘導することを見出した。以上の結果は、RseP が FecR の切断を介して *fec* 遺伝子群の発現を調節し、大腸菌の鉄取り込み制御に関与することを示唆する。大腸菌 Fec システムは牛の乳房炎の感染・発症に関与することが報告されており、本成果はそのメカニズムの解明や治療に貢献することが期待される。



RseP, a member of the intramembrane proteases of *E. coli*, is responsible for the activation of the stress-responsive transcription factor σ^E and the elimination of remnant signal peptides. Although it has been expected that RseP has additional physiological functions, little is unknown about them. In this study, we aimed to identify new substrates and physiological functions of RseP through a proteomic approach. Proteins were extracted from the membranes of cells overexpressing the wild-type RseP or its proteolytically-inactive derivative and subjected to the MS-based quantitative proteomic analysis. We found that the levels of several proteins that constitute the Fec system, which is involved in the uptake of ferric citrate, were significantly decreased in the RseP-deficient strain. A reporter assay demonstrated that RseP is required for the transcriptional activation of the *fec* operon genes. Analysis using FecR, a type II membrane-bound regulator of the *fec* genes, and its derivatives showed that FecR receives intramembrane cleavage by RseP, leading to transcriptional activation of the *fec* genes. Our study unveiled a novel physiological role of RseP: regulation of iron uptake through the intramembrane cleavage of FecR, which induces the expression of the *fec* genes.

proteomics, sigma factor, stress response

発表責任者：秋山芳展（yakiyama@infront.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3C01-06
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:00～ ミーティングルーム C

麹菌が産生する環状ペプチド デフェリフェリクリシンによる抗炎症・美白作用のマイクロアレイ解析および皮膚バリア機能改善効果の新規発見

Microarray analysis of the effect of Deferriferrichrysin on anti-inflammatory/skin-whitening and novel identification of its effect on skin-barrier function

○戸所 健彦、石田 博樹（月桂冠・総研）
○Takehiko TODOKORO, Hiroki Ishida (Res.Ins.Gekkeikan)

【背景・目的】麹菌 *Aspergillus oryzae* が産生する Deferriferrichrysin（Dfcy）は清酒から発見された環状ペプチドであり，これまでに抗炎症作用（入江ら 2012 年度本大会）や美白効果（大浦ら 2012 年度本大会）が確認されており，化粧品素材として期待される。本研究ではこれら Dfcy の有する効果の原理の解明を目的としてヒト表皮細胞発現解析試験を行い，さらにそこで得られた知見をもとに，Dfcy による表皮細胞における皮膚バリア機能（Filaggrin 産生）について検討した。

【方法・結果】-発現解析試験-　正常ヒト表皮細胞を Dfcy 含有(0.1, 0.01%)HuMediaKG2 培地にて培養し,RNA を抽出してマイクロアレイ解析を実施した。まず,炎症関連因子として *IL1A* の減少と *IL1R2*・*IL1RN* の増加が確認され，遺伝子発現レベルでの抗炎症作用が確認された。また，美白関連因子としては *PTGES*, *PTGS2*, *PLA2G4*, *SCF*(*KITLG*)などの発現減少から，表皮細胞が放出する色素沈着誘導因子の抑制による美白作用機構が示唆された。次に，皮膚バリア関連因子として角層剥離を促す *KLK* 群，保湿関連の *FLG*・*CASP14*，分化関連の *KRT1*, *TGM1*, *IVL*, *SPRR1B* の増加から，新たに Dfcy が表皮細胞分化・成熟（ターンオーバー）促進により皮膚バリア機能を増強することが示唆された。

-表皮細胞試験-　表皮細胞において実際に Dfcy がターンオーバーを促進するか，Filaggrin 産生 Dot blotting 法にて評価した。正常ヒト表皮細胞を，Dfcy 含有ウシ脳下垂体抽出物未含有 HuMedia-KG2 にて培養した。細胞を洗浄・破砕し，ニトロセルロース膜にブロッティング後，一次抗体（Filaggrin(AE21):sc-80609 antibody）と二次抗体（HRP 標識 Anti-MouseIgG）を用いて抗原抗体反応を行い，発光輝度を検出・数値化した。その結果，Dfcy0.0004%において有意な Filaggrin 増加が確認されたことから，Dfcy はフィラグリン増加を通じてターンオーバーを促進すると考えられ，皮膚バリア機能を増強する有用な化粧品素材として期待される。

Dfcy is a cyclic peptide that possess anti-inflammatory effect and skin-whitening effect *in vitro*, though its mechanism remained unknown. In this study we conducted microarray analysis to elucidate the effect of Dfcy on human epidermal cell. Inflammatory effect was confirmed by expression changes of *IL1A*, *IL1R2*, and *IL1RN*. Skin-whitening effect was confirmed by reduction of several genes that induce pigmentation. Dfcy also affected some genes that concerns epidermal turnover. The effect was further confirmed by increase of Filaggrin in Dfcy supplemented epidermal cell using antibody staining assay.

Deferriferrichrysin, skin-barrier, anti-inflammatory

講演番号：3C01-07
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:00～ ミーティングルーム C

CRISPR-Cas9 を用いたラビリンチュラ類のゲノム編集
Genome editing for thraustochytrid by using CRISPR-Cas9

○石橋 洋平、安宅 祐輔、伊東 信、沖野 望 (九大院農)
○Yohei ISHIBASHI, Yusuke ATAKA, Makoto ITO, Nozomu OKINO (Kyushu Univ.)

ラビリンチュラ類は DHA などの高度不飽和脂肪酸や多種類のステロール類を合成し、エステル体として油滴に高レベルで蓄積する海洋真核微生物である。増殖能が高く、培養も簡便、毒性・病原性も示さない為、有用脂質やバイオエネルギーの生産源として期待されている。この微生物の脂質生産性の向上を目指して、我々は遺伝子導入法や選択マーカーのリサイクル法など、各種分子育種ツールの開発を行ってきた。本研究では、ラビリンチュラ類の中でも広く利用される *Aurantiochytrium limacinum* MYA-1381 を対象として、革新的な遺伝子改変技術である CRISPR-Cas9 によるゲノム編集が適用できるか検証した。まず、ゲノム編集の成否を簡便に判定するために、GUS を発現する *A. limacinum* MYA-1381 を樹立した。この株は X-Gluc 存在下でコロニーが青色に染色される。GUS 遺伝子を標的とする crRNA と tracrRNA から gRNA を構築し、Cas9 とのリボヌクレオタンパク質（RNP）複合体を調製した。エレクトロポレーション法により RNP を *A. limacinum* MYA-1381 に導入し、X-Gluc 含有培地を用いて培養した結果、GUS 遺伝子が破壊されたと考えられる白色コロニーが出現した。このコロニーの GUS 遺伝子をシーケンスした結果、gRNA の配列に依存した塩基配列の変異が確認された。この結果より、*A. limacinum* MYA-1381 において Cas9 によるゲノム編集が可能であることが示された。

Thraustochytrids have recently received increasing attention from academic as well as industrial researchers, because they produce huge amounts of n-3 polyunsaturated fatty acids (n-3PUFA), such as docosahexaenoic acid (DHA), in conventional medium containing glucose as a carbon source. We have developed several molecular breeding tools including DNA transfection and marker recycling system. In this study, we tried to apply the gene editing technology based on CRISPR-Cas9 to *Aurantiochytrium limacinum* MYA-1381, which is widely used in the thuraustochytrid research. First, in order to easily determine the success or failure of genome editing, GUS reporter gene-expressing *A. limacinum* MYA-1381 was established. The colonies of this strain are stained blue in the presence of X-Gluc. The crRNA that recognizes GUS DNA was mixed with tracrRNA to make GUS-targeting gRNA, then incubated with Cas9 to generate ribonucleic protein (RNP) complex. RNP was introduced into *A. limacinum* MYA-1381 by electroporation method, then the transformants were grown on the PDA plate containing X-Gluc. As a result, some white colonies of which GUS might be disrupted by Cas9 were obtained. Sequencing analysis revealed that DNA mutations depending on the gRNA were occurred in the GUS gene. Our result indicates that gene editing based on CRISPR-Cas9 can be applied to *A. limacinum* MYA-1381.

Thraustochytrid, Genome editing, CRISPR-Cas9

講演番号：3C01-08
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:00～ ミーティングルーム C

紅麹抽出物によるコレラ菌の毒素産生に及ぼす生物活性

Biological activity of red mold rice extracts on cholera toxin production of V. cholerae

○新垣 梨乃[1]、比嘉 直美[2]、許 駿[2]、山城 哲[2]、橘 信二郎[1]([1]琉球大農、[2]琉球大医)
○Rino ARAKAKI[1], Naomi HIGA[2], Jun Xu[2], Tetsu YAMASHIRO[2], Shinjiro TACHIBANA[1] ([1]Fac. Agric., Univ. Ryukyus, [2]Grad. Sch. Med., Univ. Ryukyus)

紅麹菌（*Monascus* 属菌）は、東アジア、東南アジアおよび沖縄県において発酵食品や天然着色料に利用されている有用糸状菌である。コレラは、毒素産生性の *Vibrio cholerae* O1 または O139（コレラ菌）が経口的に感染して宿主腸管に定着後、コレラ毒素（CTx）を産生して下痢症を引き起こし、主に熱帯・亜熱帯地域でみられる疾患である。紅麹に抗菌活性があることは古くから知られており、食品保存料としても利用されてきた。今回、研究室所有の紅麹ライブラリーより選定した抽出物（標品）を用いて、コレラ菌に対する生物活性について調べたので報告する。紅麹菌を蒸米に植菌して 2 週間培養し紅麹を得た。紅麹をヘキサン処理し、各有機溶媒で得られた抽出物をエタノールに再溶解して標品とした。前培養した *V. cholerae* O1 El Tor N16961 株を、AKI 培地に接種して AKI-SW 法で CTx 産生を誘導した。標品を終濃度 1%となるように AKI 培地に添加し、CTx 産生に及ぼす影響を調べた。溶媒対照としてエタノール終濃度 1%を AKI 培地に添加し、CTx 産生量を比較した。標品存在下において、溶媒対照と比較して CTx 産生に標品濃度依存的な変化が観察された。このとき、コレラ菌の生菌数には大きな変化は観察されなかった。CTx 産生に対する標品の影響は、他の血清群または生物型コレラ菌に対しても同様に観察された。現在、CTx 産生に係る遺伝子の発現解析を行っている。

Monascus spp. is an edible filamentous fungus used in fermented foods and natural colorant in East and Southeast Asia and Okinawa, Japan. *Vibrio cholerae* is distributed widely in tropical and subtropical regions and causes diarrhea by the cholera toxin (CTx) produced from bacteria after infection orally, adhered and proliferated in the host small intestine. *Monascus*-fermented product, red mold rice, is well known to showing antibacterial activity and thus it has been used as a food preservative for a long. In this study, we report that the biological activities of red mold rice extracts on the CTx production of *V. cholerae* O1 biotype El Tor N16961. *Monascus* spp. stocked in our laboratory used for making red mold rice. The red mold rice extracts prepared in this study added to a culture medium, AKI media, to induce CTx production of *V. cholerae* O1. As the results, the presence of the extracts in AKI-media showed changes in CTx productivity dose-dependently. At that time, the number of living bacteria could hardly change at any concentrations of the extracts. In addition, the extracts showed same observations on other biotype strains of *V. cholerae.*

Monascus, *Vibrio cholerae*, cholera toxin

発表責任者：橘信二郎（tachiban@agr.u-ryukyu.ac.jp）

講演番号：3C01-09
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:00～ ミーティングルーム C

有機触媒グラナチシンは特異的タンパク質と結合して細胞外に存在する

An organocatalyst Granaticin is bound by a specific protein and exists extracellular space

○長安 伶奈、榎本 成美、西山 辰也、上田 賢志（日大生資科）
○ Reina NAGAYASU, Narumi ENOMOTO, Tatsuya NISHIYAMA, Kenji UEDA (College of Bioresource Sciences, Nihon Univ.)

【背景・目的】放線菌 *Streptomyces coelicolor* A3(2)が生産する二次代謝産物 actinorhodin（ACT）は、L-アスコルビン酸や L-システインの酸化反応を促進する触媒として機能する。また、ACT はその生合成クラスター中の SCO5074 と細胞外で相互作用することが判明している。これらは、これまで抗生物質とされてきた二次代謝産物に別の機能が存在することを示している。微生物由来の有機化合物が触媒として機能し、かつ細胞外でタンパク質と結合する例は ACT 以外に報告がない。そこで、その普遍性を検証する目的で類似の現象を探索した。SCO5074 のホモログを Blast 検索した結果、*Streptomyces vietnamensis* の granaticin（GRA）生合成クラスター中に存在すると判明した。そこで、GRA の触媒としての諸性質ならびにその SCO5074 ホモログタンパク質（STVN18850）との相互作用解析を行った。
【方法・結果】GRA を *S. vietnamensis* の培養上清から酢酸エチル抽出し、HPLC を用いた逆相クロマトグラフィーにより精製した。GRA が触媒であることを示すために、精製した GRA と L-アスコルビン酸とを反応させ、反応の前後で GRA が減少しないことを HPLC で確かめた。また、ICP 発光分析装置により GRA 溶液は金属元素を含まないことを確認した。従って、GRA は化学反応の前後で自身は変化せず、特定の物質の反応速度に影響を及ぼす、金属元素を含まない低分子有機化合物、すなわち有機触媒であることが判明した。続いて、GRA の触媒としての諸性質を調査したところ、至適 pH は 7.0 であり、高い熱安定性を示し、反応温度上昇とともに活性も上昇することが判明した。また、その時のストイキオメトリーから 1 分子の L-アスコルビン酸、酸素分子を消費し、1 分子の L-デヒドロアスコルビン酸、過酸化水素を生成する反応を触媒することが確認できた。さらに、Biacore を用いた相互作用解析により、GRA が STVN18850 に特異的に結合することが明らかになった。

Actinorhodin is a blue pigment antibiotic produced by *Streptomyces coelicolor* A3(2). Recently, we discovered that actinorhodin serves as a catalyst and exists in the extracellular space bound by a specific protein. These inferred that the compound retains a function different from antibiotics. Here, we discovered that granaticin produced by *Streptomyces vietnamensis* also serves as a catalyst. The lines of evidence indicate that granaticin is an organocatalyst and that it is specifically binds to a secreted protein STVN18850 encoded in the biosynthetic gene cluster.

granaticin, organocatalysts, streptomyces

講演番号：3C01-10
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:00～ ミーティングルーム C

黄麹菌の転写因子 MalR の構造・機能解析に向けた発現系の構築

Construction of expression and purification system with the aim of crystallography for functional analysis of MalR of *Aspergillus oryzae*

○小嶋 慧、小川 智久、二井 勇人、五味 勝也、日高 將文（東北大・院農）
○Kei KOJIMA, Tomohisa OGAWA, Eugene FUTAI, Katsuya GOMI, Masafumi HIDAKA (Tohoku Univ.)

【目的】黄麹菌 *Aspergillus oryzae* はデンプン分解酵素やタンパク質分解酵素の生産が特徴的な微生物である。アミラーゼ生産に関与する転写因子である MalR は、黄麹菌における生理的な機能が明らかになっている一方、類似のタンパク質を含めて立体構造は未知であり、分子レベルの活性化機構や転写制御機構も未だ不明である。そこで本研究では、MalR の機能解析に向けた結晶構造解析を目指し、発現・精製系の構築を行った。
【方法・結果】*A. oryzae* NS4 株のゲノム DNA より malR 遺伝子を増幅して発現ベクター pColdI に組み込んだ後、大腸菌 BL21 株に形質転換して目的タンパク質の発現系を構築した。発現した MalR は封入体を形成して不溶性を示したことから、変性剤・塩酸グアニジンを用いて可溶化し、精製を行った後に透析で変性剤を徐々に取り除いてリフォールディングを試みた。その結果、100 mM L-アルギニンを添加した条件下にて MalR の可溶化が確認できた。
【考察】リフォールディングによって、大腸菌 1 L 培養あたり 4.5 mg の高純度の MalR の獲得に成功した。CD スペクトル測定から精製 MalR は二次構造予測と一致する構造を形成していることが示唆された。MalR の大量発現・精製系の構築に成功したことから、現在はその結晶化条件を検討中である。本発表では、上記の研究とともに現在取り組んでいる機能解析の研究内容についても紹介したい。

MalR is a transcription factor involved in amylase production of *Aspergillus oryzae*. In this study, we established an expression and purification system with the aim of crystallography for functional analysis of MalR.

The malR gene was amplified from the genomic DNA of the *A. oryzae* NS4 and incorporated into the expression vector pColdI and transformed into the *Escherichia coli* BL21. The recombinant MalR was expressed as an inclusion body, so we solubilized MalR using a denaturant, guanidine hydrochloride, and titrated refolding conditions by dialysis. As a result, MalR was solubilized under the condition with 100 mM L-arginine. The folding of MalR was verified by CD spectrum, which is in good agreement with the predicted one. We succeeded in obtaining soluble MalR with yield of 4.5 mg per 1 L culture of *E. coli*. We are currently investigating the crystallization conditions.

MalR, *Aspergillus oryzae*, L-arginine

講演番号：3C01-11
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:00～ ミーティングルーム C

Aspergillus oryzae における菌体内 metalloendopeptidase insulysin ホモログの局在解析

Localization analysis of intracellular metalloendopeptidase, insulysin homolog in *Aspergillus oryzae*

○小川 翠、溝上 哲哉、鈴木 遥、佐々木 信光、山形 洋平（農工大院応生化）
○ Midori OGAWA, Tetsuya MIZOKAMI, Haruka SUZUKI, Nobumitsu SASAKI, Yohei YAMAGATA (Tokyo Univ. of Agriculture and Technology)

Insulysin は真核生物で広く見られる metalloendpeptidase の一つである。酵母 insulysin はミトコンドリアに局在し、プロセッシングされたプレペプチドの分解に関与している 1)。黄麹菌 *Aspergillus oryzae* には、insulysin のホモログが 3 種類存在する（以下 InsA、InsB、InsC）。InsA、InsC は酵母の insulysin との相同性が高いことから類似した機能を有すると考えられるが、 InsB はヒトや酵母の insulysin との相同性が低く、麹菌特異的な役割を担っていると考えられる。また欠損株の観察により *A. oryzae* の insulysin は TOR 経路に関与している可能性が示唆されている 2)。

本研究では InsA、InsB、InsC の機能を解析するにあたり、InsA、InsB、InsC と HA tag、DsRed の融合タンパク質発現株を作製し、まず蛍光観察による局在解析を行った。蛍光観察の結果、InsA はミトコンドリアへの局在が示唆され、InsB、InsC ではミトコンドリア及び細胞質への局在が示唆された。さらに、細胞分画及びウエスタンブロット解析を用いた生化学的解析を行った結果、InsA はミトコンドリアに局在することが明らかとなった。

Insulysin is one of the metallopeptidases widely present in eukaryotes. In *Saccharomyces cerevisiae*, insulysin localize in mitochondria, and involve in degrading presequence peptides 1). *Aspergillus oryzae* has 3 genes coding insulysin homolog (*insA, insB, insC*) . InsA and InsC seem to have similar functions with insulysin homologs in *S. cerevisiae,* since they are highly homologous with insulysins in yeast. On the other hand, InsB seems to have specific function in *A. oryzae,* since it showed homologies with insulysins in human and yeast. By the observation of deletion strains, it is suggested that insulysins in *A. oryzae* might involve in TOR pathway 2).

In this study, we prepared strains expressing each DsRed-tagged insulysin and analyzed localization by fluorescence microscopy to clarify the functions of InsA, InsB and InsC. The result indicated that InsA would be localized in mitochondria, and InsB and InsC might be localized in both mitochondria and cytoplasm. Moreover, biochemically analysis by cell fractionation and western blotting also indicated that InsA is localized in mitochondria.

1）Asli Aras Taskin ,et al. Mol Biol Cell. 28:997-1002 (2017)
2）鈴木遥ら 日本農芸化学会 2017 年度大会要旨集

Aspergillus oryzae , insulysin, localization

講演番号：3C01-12
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:00～ ミーティングルーム C

麹菌および植物病原糸状菌における各炭素源特異的な SSPs の同定

Identification of SSPs specific to several carbon substrates in *Aspergillus oryzae* and phytopathogenic filamentous fungi

○寺内 裕貴[1,2]、吉田 裕史[1]、田中 千尋[1,2]、本田 与一[1]、河内 護之[1]、吉見 啓[1] ([1]京大農、[2]京大学堂)
○Yuki Terauchi[1,2], Hiroshi Yoshida[1], Chihiro Tanaka[1,2], Yoichi Honda[1], Moriyuki Kawauchi[1], Akira Yoshimi[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Kyoto Univ. GES)

【背景・目的】糸状菌は宿主や栄養基質に侵襲する際、栄養基質の分解酵素と共に、低分子量分泌タンパク質（Small secreted proteins; SSPs）を多種類分泌する。一般に、SSPs はアミノ酸残基数が 300 以下であり、その多くは既知ドメインを持たず、機能についても不明な点が多い。麹菌 *Aspergillus oryzae* は、生分解性ポリエステルを分解する際、SSPs の一種である界面活性タンパク質 hydrophobin RolA を分泌する。さらに、RolA はポリエステル分解酵素 cutinase CutL1 と相互作用して基質分解を促進することも知られている（Takahashi *et al.*, 2005）。一方、RolA–CutL1 と類似の関係が他の SSPs と栄養基質分解酵素との間に成立しているか否かは不明である。そこで本研究では、*A. oryzae* および植物病原菌 *Bipolaris maydis*、*Botrytis cinerea* をポリエステルやセルロース、リグニン、ヘミセルロースなどの様々な栄養基質を単一炭素源として培養し、セクレトームおよびトランスクリプトーム解析を用いて基質分解酵素と共に分泌される SSPs を解析することを目的とした。
【方法・結果】*A. oryzae* の培養上清中のタンパク質を SDS-PAGE に供し、Xylan 特異的に分泌されるタンパク質を数種類見出した。これらを LC-MS 解析したところ、Hydrophobin RolA、HypB を含む SSPs であることが判明した。現在、これらをコードする遺伝子の発現量を定量 RT-PCR 法により解析しつつ、各遺伝子破壊株の造成を進めている。また、セルロースを単一炭素源とした固体培養において、*B. maydis* が特異的に分泌するタンパク質を幾つか見出した。さらに、*B. cinerea* についても各栄養基質に特異的 SSPs の分泌条件を検討したので、*B. maydis* におけるタンパク質解析結果と合わせて議論したい。

Filamentous fungi secrete many types of small secreted proteins (SSPs) together with substrate-degrading enzymes (SDEs). In general, SSPs have 300 or less amino acid residues, many of which do not have known domain, and little is known their function. In *Aspergillus oryzae*, it is known that RolA (hydrophobin) interacts with cutinase CutL1 to promote the substrate (polyesters) degradation. However, it is unclear whether there is a similar relationship with RolA–CutL1 between other SSPs and SDEs. In this study, to analyze the function of SSPs in filamentous fungi, several fungi such as *A. oryzae*, *Bipolaris maydis*, and *Botrytis cinerea* were cultivated in various substrates such as polyester, cellulose, lignin, and hemicellulose as the sole available carbon source. We have identified several substrate-specific SSPs in *A. oryzae* and *B. maydis*, and will present the results with the secretory conditions of the SSPs.

Small secreted proteins, *Aspergillus oryzae*, Phytopathogenic filamentous fungi

発表責任者：寺内裕貴（terauchi.yuki.76a@st.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3C01-13
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:00～ ミーティングルーム C

麹菌の菌糸接着因子制御株を用いた酵素生産向上と培養液流動性の改善
Improvement of productivity of recombinant protein and fluidity by the mutant with regulation of hyphal adhesion factor in *Aspergillus oryzae*

○市川 暉[1]、加藤 好一[2]、宮澤 拳[1]、田畑 風華[1]、古明地 敬介[1]、吉見 啓[3,4]、阿部 敬悦[1,4]([1]東北大農、[2]佐竹化学攪拌技術研、[3]京大院農、[4]東北大 NICHe)
○Hikaru Ichikawa[1], Yoshikazu Kato[2], Ken Miyazawa[1], Fuka Tabata[1], Keisuke Komeiji[1], Akira Yoshimi[3,4], Keietsu Abe[1,4] ([1]Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ., [2]Mixing Technol. Lab., Satake Chem. Equipment, [3]Grad. Sch. Agric. Sci., Kyoto Univ., [4]NICHe, Tohoku Univ.)

【背景】糸状菌の液体培養では、高密度培養時に培養液粘度が増加し、流動性が低下することにより、培養液の混合状態が悪化する。我々はこれ迄に産業用糸状菌の麹菌において菌糸接着因子がガラクトサミノガラクタン(GAG)と α-1,3-グルカン(AG)であることを明らかにした。また両接着因子を欠損させることで菌糸完全分散株の作製に成功した 1)。ジャー型発酵槽(5 L)を用いた培養において完全分散株を培養すると、野生株と比較して培養液粘度の低下と酵素生産量の増加が確認された 2)。しかし、一般的には菌糸分散株は高攪拌動力域での剪断ダメージが予想されるので、本研究では菌糸接着因子の AG 生産量の制御により小菌糸塊株を作製し、菌糸分散性と酵素生産性の関係を検討した。
【方法と結果】麹菌の GAG 欠損株を親株として、AG 主要合成酵素をコードする *agsB* のプロモーターを改変し、*agsB* 発現量低減株(P*agsB* 改変株)を作製した。次に、野生株、完全分散株、P*agsB* 改変株にモデル酵素としてクチナーゼをコードする遺伝子 *cutL1* を 1 コピー導入した。これら 3 株をジャー型発酵槽を用いて 660 rpm で 60 時間培養を行った。その結果、培地中への CutL1 分泌量は完全分散株と P*agsB* 改変株は同程度で、野生株と比べて高かった。また、培養液の非ニュートン性は野生株、P*agsB* 改変株、完全分散株の順に強かった。次に、培養層内の数値流体解析を行い、培養液の流体特性の違いがもたらす培養槽内の物理的諸量の差を計算した。その結果、完全分散株、P*agsB* 改変株、野生株の順に流動性が良く、P*agsB* 改変株と完全分散株は類似した流動を示すことが示唆された。以上の結果より、菌糸接着因子の発現制御により、酵素生産量と流動性を両立させることに成功した。
Although the dual disruptant of genes encoding α-1,3-glucan and galactosaminogalactan (GAG) synthesis (AGΔ-GAGΔ) showed increased CutL1 production in submerged culture of *Aspergillus oryzae*[1)], the dispersed hyphae of the AGΔ-GAGΔ is presumed to be weak against shear-stress generated by the high speed agitation in a lab scale fermenter[2)]. We here constructed the mutant with promoter deletion of the *agsB* (Δ*agsB*), which encodes primary α-1,3-glucan synthase, to control sizes of hyphal pellets, and evaluated the relationship between the sizes of hyphal pellets and CutL1 productivity. The Δ*agsB* as well as AGΔ-GAGΔ secreted increased amount of CutL1 compared to the wild-type. By computational fluid dynamics simulation, Δ*agsB* and AGΔ-GAGΔ showed improved flow patterns in the reactor, suggesting that productivity could be improved by modifying the adhesion factor.
1) Miyazawa et al. Front. Microbiol. (2019) 10:2090; 2) 市川ら、第 70 回生物工学会大会要旨集 P. 129

Aspergillus oryzae, enzyme production, CFD simulation

発表責任者：市川　暉（hikaru.ichikawa.t3@dc.tohoku.ac.jp）

講演番号：3C01-14
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:00～ ミーティングルーム C

ハイドロフォビン RolA の Langmuir 膜に対するポリエステラーゼ CutL1 特異的吸着の検出系確立
Development of the method to detect polyesterase CutL1 recruited to the Langmuir film of fungal surfactant protein hydrophobin RolA

○齋藤 有美[1]、寺内 裕貴[2]、吉見 啓[2]、田中 拓未[3]、三ツ石 方也[4]、藪 浩[5]、阿部 敬悦[1]([1]東北大農、[2]京都大農、[3]農研機構、[4]東北大工、[5]東北大材料科学)
○ YUMI SAITO[1], YUKI TERAUCHI[2], AKIRA YOSHIMI[2], TAKUMI TANAKA[3], MASAYA MITSUISHI[4], HIROSHI YABU[5], KEIETSU ABE[1] ([1]Tohoku Univ. Agriculture, [2]Kyoto Univ. Agriculture, [3]NARO, [4]Tohoku Univ. Engineering, [5]Tohoku Univ. AIMR)

【目的】黄麹菌 *Aspergillus oryzae* が産生する界面活性タンパク質 hydrophobin RolA は界面で自己組織化し、*β*-amyloid 様構造の分子膜を形成する[1]。また、 RolA は生分解性ポリエステル polybutylene succinate-*co*-adipate（PBSA）に吸着後、 PBSA 分解酵素 polyesterase CutL1 を表面にリクルートし、分解促進する[2]。当研究室では、 RolA がイオン的相互作用により CutL1 をリクルートすることを明らかにした[3]。一方、 CutL1 が RolA 分子膜下の PBSA 表面へ到達する分子機構は不明である。そこで、 RolA-CutL1 相互作用の分子機構の可視化を目指し、前任者は Langmuir 膜作製法により緻密な RolA 分子膜（RolA L 膜）を作製した[1]。本研究では、 RolA L 膜による CutL1 リクルート可視化及び、 PBSA 表面への CutL1 到達モデル構築を目指し、 RolA L 膜上の CutL1 検出系確立を試みた。

【方法・結果】 SiO_2 基板上に RolA L 膜を作製した。免疫染色により基板上の RolA L 膜の特異的検出に成功し、免疫染色と原子間力顕微鏡（AFM）による RolA L 膜の可視化法を確立した。次いで、作製した RolA L 膜基板に CutL1 と BSA（ネガティブコントロール）を吸着させて、蛍光標識抗体及び AFM により検出することで、 CutL1 の RolA への結合特異性の評価を試みている。

【Purpose】The surfactant hydrophobin RolA produced by *Aspergillus oryzae* is adsorbed and self-assembled on solid surfaces[1]. RolA adsorbed on PBSA recruits polyesterase CutL1 to promote PBSA degradation [2]. We have shown that RolA recruits CutL1 by ionic interaction [3], but the mechanism how CutL1 reaches PBSA surface through RolA-coated layer. We had previously made a RolA L membrane by the Langmuir membrane method [1]. In the present study, we tried to detect CutL1 attachment to RolA L membrane formed on silicon wafer.

【Methods and results】 RolA L films were transferred to silicon wafers. RolA L membranes on silicon plates were detected by immunostaining and an atomic force microscopy (AFM). In order to detect CutL1 adsorption to RolA L membrane, the RolA L membranes formed on silicon plates were immersed in CutL1 or BSA (negative control) solution. We discuss CutL1 adsorption to RolA L membranes by two methods such as immunostaining using fluorescent-labeled anti-CutL1 antibody and an AFM.

[1] Terauchi et al, Biosci. Biotechnol. Biochem. (2020); [2] Takahashi et al, Mol. Microbiol. (2005); [3] Takahashi et al, Mol. Microbiol. (2015)

hydrophobin, polyesterase, protein-interaction

発表責任者：阿部敬悦（keietsu.abe.b5@tohoku.ac.jp）

講演番号：3C03-01
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:00～ ミーティングルーム C

Aspergillus oryzae 001 を用いたアワビ内臓発酵物の IL-12 産生誘導による免疫調整機能
Immunomodulatory function by inducing IL-12 production of fermented abalone using *Aspergillus oryzae* 001

○竹谷 佳弥乃[1]、舞沢 友昭[2]、濱田 奈保子[1]([1]東京海洋大院・食品流通安全管理、[2]ブルドックソース株式会社)
○Kayano TAKEYA[1], Tomoaki MAIZAWA[2], Naoko HAMADA[1] ([1]Tokyo Univ. Marine Sci. Technol., [2]BULL-DOG SAUCE CO.,LTD.)

【目的】アワビの内臓は、現状、そのほとんどが廃棄されている海洋未利用資源であり、その有効活用が求められる。今日、がんや高血圧をはじめとする生活習慣病は患者数の増加が問題視されている。生活習慣病と食事は非常に密接に関係しており、食事により罹患のリスクを低減することが出来るため、疾患を予防することができるヘルスフードの開発は非常に重要である。本研究では、*Aspergillus oryzae* 001 を用いて発酵したアワビ内臓粉末の IL-12 産生誘導による免疫調整機能を有するヘルスフードの開発を目的とした。
【方法】凍結乾燥させ粉末化したアワビ内臓を含む培地を作製し、前培養した *A. oryzae* 001 を植菌し、6 日間、28℃で回転振盪培養した。培養後、アワビ内臓培地を凍結乾燥させ、水抽出した試料を遠心分離し、得られた上清の IL-12 産生誘導活性を測定した。
【結果】*A. oryzae* 001 発酵アワビ内臓の水抽出上清において、植菌直後と比較し、発酵試料における IL-12 産生量は 5 倍以上増加した。
【結論】アワビ内臓は、*A. oryzae* 001 発酵により IL-12 産生誘導活性の増強が可能であった。過去に我々は、同菌を用いて発酵させたアワビ内臓に関して、ACE 阻害による血圧上昇抑制効果を報告した[1)]。本研究により新たに免疫調整機能が確認された *A. oryzae* 001 アワビ内臓発酵物は、生活習慣病に対し有用なヘルスフード素材となることが示唆された。

1）川上 瑞規[1], 志村 茉莉子[2], 濱田 奈保子[1] ([1]東京海洋大院・食品流通安全管理, [2]ブルドックソース株式会社)
Aspergillus oryzae 001 を用いたアワビ内臓発酵物のアンジオテンシン変換酵素阻害物質の単離・精製および阻害様式の解明, 日本農芸化学会関東支部 2018 年度支部大会講演要旨集, p. 29

Abalone viscera are currently an underutilized marine resource. In order to utilize them as effective food resources, the abalone viscera were fermented by filamentous fungi *Aspergillus oryzae* 001. The culture medium exhibited IL-12 production-inducing activity and an immunomodulatory function. This suggests that *A. oryzae* 001 fermented abalone viscera could be a useful health food material against lifestyle-related diseases.

IL-12, fermented food, Immunomodulatory

発表責任者：濱田奈保子（hsnaoko@kaiyodai.ac.jp）

講演番号：3C03-02
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:00～ ミーティングルーム C

植物性発酵乳における菌体外多糖の免疫活性

Immunological activity of expolysaccharides on fermented plants milk

○仲田 創[1,2]、友清 帝[2,3]、北原 秀悟[2,3]、平光 正典[1]、井上 孝司[1]、北澤 春樹[2,3]([1]ポッカサッポロフード＆ビバレッジ株式会社、[2]東北大・院・農、[3]CFAI)
○ HAJIME NAKATA[1,2], MIKADO TOMOKIYO[2,3], SHUGO KITAHARA[2,3], MASANORI HIRAMITSU[1], TAKASHI INOUE[1], HARUKI KITAZAWA[2,3] ([1]Pokka Sapporo Food & Beverage, [2]Tohoku Univ., [3]CFAI)

【目的】
近年、健康・宗教・サステナビリティなどの理由から豆乳やアーモンドミルクなどの植物性の飲料が世界的に拡大しており、日本でもこれらの発酵乳が普及してきている。一方、ある種類の乳酸菌の産生する菌体外多糖（EPS）は免疫活性を有しており、ヨーグルトではヒト試験で風邪症候群の罹患リスクを低減させることが報告されている。しかし植物性の発酵乳に関しては知見が少ない。そこで本研究では、豆乳の発酵に用いられている菌体外多糖産生菌である *Streptococcus thermophilus* SBC8781 株に着目し、特に糖源の種類が及ぼす免疫調節機能への影響を評価した。
【方法・結果】
市販の牛乳、豆乳、アーモンドミルク、ココナッツミルク、ライスミルクの糖組成を、HPLC によって分析した。その結果、牛乳ではラクトースが、豆乳とアーモンドミルク、ココナッツミルクではスクロースが、ライスミルクではグルコースが主要な糖であった。そこで、各糖を唯一の糖源とした培地で *S. thermophilus* SBC8781 株を培養し、上清からエタノール沈殿によって EPS を精製した。その結果、EPS の収量に違いは見られなかった。
ブタ腸管上皮細胞(PIE 細胞)を各 EPS で刺激し、さらに LPS で炎症を誘導したのち、炎症性サイトカインの mRNA 発現量を定量解析することで、抗炎症活性を評価した。その結果、スクロースを糖源とした EPS で、これらの炎症性サイトカインの発現量が有意に抑制された。
次に、マクロファージ様 J774.1 細胞を各 EPS で刺激し、細胞における IL-12 の mRNA 発現量を評価した。また上清を回収し、ELISA 法によって IL-12 のタンパク量を測定することで、NK 活性を評価した。その結果、グルコースを糖源とした EPS で、IL-12 の mRNA 量およびタンパク量が有意に増加した。
以上の結果より、基質となる糖の種類によって、EPS の免疫調節作用が変化する可能性が考えられた。現在、実際の植物性の発酵乳でも効果を検証中である。

Plant based fermented milk such as the soy and almond become widespread for health, religional and environmental reasons. They are known that the type of sugar was different in the different plants and that exopolysaccharides(EPS) produced from sugar by lactic acid bacteria have immunological function. In this study, an effect of the type of sugar on the immunological functions of EPS produced by *Streptococcus thermophilus* SBC8781 was evaluated.

EPS, immunology, lactic acid bacteria

講演番号：3C03-03
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:00～ ミーティングルーム C

ヒト単球細胞株 THP-1 から分化誘導した M1 型マクロファージの Toll-like receptor7/8 アゴニストに対する免疫応答性

Effects of Toll-like receptor 7/8 agonist on the immune response in M1-type macrophages polarized from the human monocyte cell line THP-1

○飛田 啓輔、小田木 美保（茨城産技セ）
○Keisuke TOBITA, Miho ODAGI (Indust. Tech. Innov. Center Ibaraki Pref.)

Toll-like receptor (TLR) 7/8 はウィルスの一本鎖 RNA を認識する。M1 型マクロファージにおける TLR7/8 シグナルの活性化は，炎症性サイトカイン産生を介して抗ウィルス応答を引き起こす。本研究では，ヒト単球細胞株 THP-1 から分化誘導した M1 型マクロファージを用いて，TLR7/8 アゴニストで刺激した時の免疫応答性について調べた。その結果，Resiquimod で刺激した M1 型マクロファージでは炎症性サイトカイン遺伝子発現の亢進が見られた。また，M1 型マクロファージを MALP-2 と Resiquimod で共刺激すると，それぞれ単独の場合と比較して炎症性サイトカイン遺伝子発現の亢進が見られた。このように，THP-1 から分化誘導した M1 型マクロファージは，TLR7/8 アゴニストの刺激により炎症性サイトカイン遺伝子発現が亢進され，その作用は TLR2 アゴニストの存在下で助長されることがわかった。

Toll-like receptor (TLR) 7 and TLR8 are intracellular sensors located in endosomes that recognize single-stranded RNA. The TLR7/8 signal in M1-type macrophages elicits an antiviral response through the production of inflammatory cytokines. In this study, we investigated the immune responses of type-1 macrophages, which were induced to differentiate from the human monocyte cell line THP-1, stimulated with TLR7/8 agonists. M1-type macrophage polarization was induced using lipopolysaccharide and interferon-γ. The expression of inflammatory cytokine genes increased in M1-type macrophages stimulated with Resiquimod. In addition, when M1-type macrophages were co-stimulated with MALP-2 and Resiquimod, the expression of inflammatory cytokine genes increased as compared with the case of each alone. Thus, the expression of inflammatory cytokine genes is enhanced by stimulation with a TLR7/8 agonist, and those effects are promoted in the presence of a TLR2 agonist in M1-type THP-1 macrophages.

Virus, M1-type macrophage, Toll-like receptor

発表責任者：飛田啓輔（tobita@itic.pref.ibaraki.jp）

講演番号：3C03-04
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:00～ ミーティングルーム C

植物マイクロ RNA の肺線維化抑制作用

Inhibitory effect of plant microRNA on pulmonary fibrosis

○山本 真生[1]、疋田 愛[1]、小川 史代[1]、島田 優[1]、熊添 基文[1]、藤村 由紀[1]、中曽根 光[2]、米倉 円佳[2]、立花 宏文[1]([1]九大院農院・生機科、[2]トヨタ自動車・アグリバイオ事業部)
○Mao YAMAMOTO[1], Ai HIKIDA[1], Fumiyo OGAWA[1], Yu SHIMADA[1], Motofumi KUMAZOE[1], Yoshinori FUJIMURA[1], Akari NAKASONE[2], Madoka YONEKURA[2], Hirofumi TACHIBANA[1] ([1]Kyushu Univ., [2]TOYOTA Motor Corporation ・ Agriculture and Biotechnology business div.)

マイクロ RNA は標的 mRNA に相補的に結合することで遺伝子の機能を制御する。近年、食餌性の植物マイクロ RNA（MIR）が動物体内において作用する可能性が示され、界を越えたマイクロ RNA の機能が注目されている。そこで本研究では、植物 MIR の新たな機能性を解明することを目的とし、肺線維化抑制を期待できる植物 MIR の探索を試みた。

ヒト血液中に存在する植物 MIR のうち、osa-miR172d-5p が TGFβシグナルに重要な TGF-beta activated kinase 1 binding protein 1（TAB1）と高い相補性を有することを見出した。Bleomycin 投与により肺線維化を誘導したマウスを用いて osa-miR172d-5p が TAB1 の発現に与える影響を検討したところ、osa-miR172d-5p mimic 投与により TAB1 の発現が抑制された。肺線維化に対する osa-miR172d-5p の影響を検討するために、肺線維化の度合いをマッソントリクローム染色にて評価した。その結果、osa-miR172d-5p mimic 投与により肺線維化が改善した。以上より、osa-miR172d-5p は TAB1 を標的とすることで TGFβシグナル伝達経路を抑制し、肺線維化を改善することが示された。

MicroRNAs regulate gene function by binding to target mRNAs in a complementary manner. Recent studies suggest a potential cross-kingdom action of plant-derived miRNAs (MIRs) through dietary intake and regulating mammalian gene expressions. Here, we report the inhibitory effect of MIRs on pulmonary fibrosis. Among the plant MIRs detected in human blood, osa-miR172d-5p was predicted to target TGF-beta activated kinase 1 binding protein 1 (TAB1), which is essential for TGFβ signaling. osa-miR172d-5p mimic treatment suppressed the expression of TAB1 in mice with bleomycin-induced pulmonary fibrosis. To investigate the effect of osa-miR172d-5p on pulmonary fibrosis, we assessed the degree of pulmonary fibrosis by Masson trichrome staining. Our analysis showed that administration of osa-miR172d-5p mimic improved pulmonary fibrosis. These results suggest that osa-miR172d-5p suppresses the TGFβ signaling pathway by targeting TAB1 and prevents pulmonary fibrosis.

plant microRNA, fibrosis, TGFβ

講演番号：3C03-05
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:00～ ミーティングルーム C

Lactobacillus plantarum OLL2712 株の経口投与が高脂肪食を摂取したマウス体内における抗炎症作用を発揮する経路の検討

Study of the anti-inflammatory mechanism in high-fat diet mice by the oral administration of *Lactobacillus plantarum* OLL2712

○王 イバイ[1]、高野 智弘[1]、周 英ギョク[2]、王 蓉[1,2]、田之倉 優[1,2]、宮川 拓也[2]、足立（中嶋） はるよ[1]、八村 敏志[1]（[1]東大院農生科・食の安全研セ、[2]東大院農生科・応生化）
○Yimei WANG[1], Tomohiro TAKANO[1], Yingyu ZHOU[2], Rong WANG[1,2], Masaru TANOKURA[1,2], Takuya MIYAKAWA[2], Haruyo ADACHI(NAKAJIMA)[1], Satoshi HACHIMURA[1] ([1]Res. Cent. Food Safety, Univ. Tokyo, [2]Dept. Appl. Biol. Chem. , Univ. Tokyo)

【目的・方法】肥満によって慢性炎症状態が引き起こされ、乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* OLL2712 株の炎症抑制効果について報告されている。本研究では脂肪組織および腸管免疫系に着目し、本乳酸菌の経口投与が炎症抑制作用を発揮する経路について検討した。C57BL/6 マウスに、脂肪分 60%カロリー比高脂肪食を計 4 週間自由摂取させた。高脂肪食摂食開始 1 週間後から、*L. plantarum* OLL2712 株加熱死菌体を 3 週間、1 日 1 回 4 mg を胃ゾンデにより経口投与し、対照群には滅菌水を同様に 3 週間経口投与した。マウスの脂肪組織、腸内細菌叢、腸管免疫系を解析した。
【結果】本乳酸菌株の経口投与により、脂肪組織から分画された免疫細胞を含む集団である間質血管細胞群において、炎症性サイトカインである IL-1β が抑制され、マクロファージの浸潤に関わる C-C motif chemokine 2 (CCL2)の発現が抑制された。腸管では、肥満に関与する腸内細菌の偏りが解消され、高脂肪食によって増加した *Lactococcus* と *Clostridium* subcluster XIVa が減少した。結腸組織においては、CCL2 の発現が抑制された。本乳酸菌は腸に作用し、腸管バリア破綻の緩和や腸管内代謝物の変化によって、脂肪組織の炎症が抑えられる可能性が示唆された。

Aim and Methods: As a lactic acid bacterium (LAB) strain, *Lactobacillus plantarum* OLL2712 strain was expected to relieve chronic inflammation caused by obesity. In this study, we investigated the pathway by which oral administration of the LAB strain suppressed the inflammation, focusing on adipose tissue and intestinal immune system. We fed C57BL / 6 mice a 60 kcal% fat diet for 4 weeks, and orally administered heat-killed *L. plantarum* OLL2712 to the mice from the second week. We evaluated the effects of OLL2712 on adipose tissue, the gut microbiota and intestinal immune system.
Results: In the adipose-derived stromal vascular fraction, the oral administration of the LAB strain suppressed the expression of the inflammatory cytokines IL-1β and C-C motif chemokine 2 (CCL2), which is involved in macrophage infiltration. In the intestine, we found that the LAB strain ameliorated microbiota dysbiosis associated with obesity, reducing the relative abundance of *Lactococcus* and *Clostridium* subcluster XIVa which was increased by the high fat diet. In colon tissue, the gene expression of CCL2 was suppressed. Our results suggested the possibility that the LAB strain might act on the gut first, and finally inhibit inflammation in the adipose tissue by alleviating intestinal permeability or regulating the production of intestinal metabolites.

anti-inflammation, gut microbiota, *Lactobacillus plantarum*

発表責任者：八村敏志（ahachi@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3C03-06
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:00～ ミーティングルーム C

緑茶カテキン EGCG はマクロファージにおいて 67-kDa laminin receptor 依存的に miRNA 発現を調節し抗炎症作用を発揮する

Green tea catechin EGCG regulates miRNA expression and exerts anti-inflammatory effects in a 67-kDa laminin receptor dependent manner in macrophages

○西岡 成汰、冨岡 玲乃、小原井 春香、村田 京介、福富 拓哉、山田 脩平、熊添 基文、藤村 由紀、立花 宏文（九大院農院・生機科）
○ Seita NISHIOKA, Reno TOMIOKA, Haruka KOBARAI, Kyosuke MURATA, Takuya FUKUTOMI, Shuhei YAMADA, Motofumi KUMAZOE, Yoshinori FUJIMURA, Hirofumi TACHIBANA (Kyushu Univ.)

緑茶カテキンの一種である (—)-epigallocatechin-3-*O*-gallate (EGCG) は 67-kDa laminin receptor (67LR) を介して抗炎症作用をはじめとした多彩な生体調節作用を発揮する。また、microRNA (miRNA) は約 20 塩基の 1 本鎖非翻訳 RNA の一種であり、種々の生体調節作用を示す。しかしながら、EGCG の 67LR を介した抗炎症作用に miRNA が関与するかは不明である。そこで本研究では、骨髄性細胞特異的 67LR ノックアウトマウス (67LR-KO マウス) を用いて EGCG の 67LR を介した抗炎症作用における miRNA の関与を検討した。

対照マウスおよび 67LR-KO マウスの腹腔より採取したマクロファージを EGCG 処理し、次世代シーケンサーにより miRNA 発現を解析した。その結果、EGCG によって誘導された miRNA の発現変動は 67LR-KO マウスでは全く観察されなかった。EGCG 処理により発現が変動した miRNA のうち、miR-181a-1-3p は TNF-α を、miR-155-5p は抗炎症作用に関与する PPARγ を標的とする。EGCG 処理した対照マクロファージにおいてこれら遺伝子の発現が抗炎症方向に変動したが、67LR-KO マウスではこれら遺伝子発現の変動は観察されなかった。さらに、EGCG は抗炎症性マクロファージの表現型である M2 型への分極を促進したが、この作用も 67LR-KO マウスでは見られなかった。以上より、マクロファージにおける EGCG の抗炎症作用に、67LR 依存的に発現が調節される miRNA が関与することが示された。

Green tea catechin EGCG exerts a variety of physiological effects including anti-inflammatory effects through 67-kDa laminin receptor (67LR). MicroRNAs (miRNAs), a type of non-cording RNA, involved various biological processes by regulating their target genes. However, whether miRNAs are involved in anti-inflammatory effects of EGCG through 67LR remains unclear. Here, we show that EGCG alters miRNA expression and exerts anti-inflammatory effects in a 67LR-dependent manner. EGCG up-regulated miR-181a-1-3p targeting TNF-α and down-regulated miR-155-5p regulating PPARγ which involves anti-inflammatory effects in macrophages, and EGCG down-regulated TNF-α and up-regulated PPARγ in a 67LR-dependent manner. Next, we assessed the polarization to M2 type in macrophages and found that EGCG promoted M2 polarization in a 67LR-dependent manner. These results indicate that miRNAs are involved in the 67LR-dependent anti-inflammatory effects of EGCG in macrophages.

EGCG, 67LR, anti-inflammation

講演番号：3C03-07
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:00～ ミーティングルーム C

ターメリックオイルが高脂肪食給餌マウスの脂質代謝並びに肥満に及ぼす影響

The effect of turmeric oil on the lipid metabolism in high fat diet-induced obesity model mouse

○荒井 孝志[1]、青木 勇樹[1]、奥江 紗知子[2]、三浦 徳[3]、増澤(尾﨑) 依[1]、細野 崇[1,2]、関 泰一郎[1,2,3]
([1]日大・生資科・生命化、[2]日大・生資科・応生科、[3]日大・生資科・総合研究所)
○Takashi ARAI[1], Yuuki AOKI[1], Sachiko OKUE[2], Atsushi MIURA[3], Yori OZAKI-MASUZAWA[1], Takashi HOSONO[1,2], Taiichiro SEKI[1,2,3] ([1]Nihon Univ., [2]Nihon Univ. Grad. School, [3]Nihon Univ. General Research Institute)

【背景･目的】ウコン(*Curcuma longa*)の精油であるTurmeric oil(TO)は、α-turmerone, β-turmerone, ar-turmeroneなどのセスキテルペノイドを含んでおり、肝機能改善作用、抗炎症作用、認知機能改善作用などが報告されている。本研究では、TOの抗肥満効果と脂質代謝に及ぼす影響について検討した。
【方法】C57BL/6Jマウスを40 kcal% Lard含有高脂肪食を与えるcontrol群、0.5% TO添加高脂肪食を与える0.5% TO群、1% TO添加高脂肪食を与える1% TO群に分けた。飼育期間中、摂餌量、体重の測定は1週間に1回行った。4週間後、血液、肝臓、脂肪組織を回収し、各種生化学的解析並びに脂質代謝系遺伝子や体熱産生系遺伝子の発現についてqPCRによる解析を行った。
【結果】Control群と比較して0.5% TO群、1% TO群において体重増加は有意に抑制されたが、摂餌量は0.5%TO群で有意に、1%TO群においても減少する傾向を示した。血漿ALT, AST活性、肝臓、腎臓、脾臓、筋肉重量は両群で差はなかったが、各種白色脂肪組織の重量は有意に減少していた。また、肝臓中トリアシルグリセロール含有量は有意に低下したが、肝臓中コレステロール含有量は変化しなかった。肝臓の脂質合成系遺伝子であるFasn, Scd1発現量は顕著に減少し、褐色脂肪組織における体熱産生遺伝子UCP-1, Cidea発現量は顕著に増加した。TOは高脂肪食摂取時の脂質代謝並びに体熱産生関連遺伝子の発現に影響を及ぼすことが明らかになった。

Turmeric oil (TO) is an essential oil of turmeric (*Curcuma longa*). The aim of this study was to clarify the effect of TO on lipid metabolism in high fat (HF) diet-induced obese model mice. C57BL/6J mice were divided into a control group fed the HF diet containing 40 kcal% lard, 0.5% TO group, and 1% TO group, and were fed these diets for 4 weeks. Body weight gain was significantly suppressed in both the 0.5% TO and 1% TO groups compared to the control group. Food intake also decreased in the 0.5% TO group. Plasma ALT and AST activity, liver, spleen, and muscle weights were not different between the two groups, but white adipose tissue was significantly reduced in the TO group. The TG content in the liver was significantly reduced by TO, but not the cholesterol content in the liver. Expression levels of the hepatic lipogenic genes, Fasn and Scd1 were significantly reduced in the TO groups. On the other hand, thermogenic genes UCP-1 and Cidea in brown adipose tissue was significantly induced by TO. TO affects the lipid metabolism through lipogenic and thermogenic gene expressions.

Turmeric oil, lipid metabolism, obesity

発表責任者：関泰一郎（seki.taiichirou@nihon-u.ac.jp）

講演番号：3C03-08
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:00～ ミーティングルーム C

ビタミン A 代謝変動を介して NAFLD 発症を予防する玄米成分の探索

Search for brown rice ingredients that prevent the onset of NAFLD through changes in vitamin A metabolism

○本郷 篤一[1]、松本 雄宇[2]、鈴木 司[2]、井上 順[1,2]、山本 祐司[1,2]([1]東農大院・応生科・農化、[2]東農大・応生科・農化)
○Atsuhito Hongo[1], Yu Matsumoto[2], Tsukasa Suzuki[2], Jun Inoue[1,2], Yuji Yamamoto[1,2] ([1]Tokyo Univ. of Agric., Grad. Sch. of Agric. Chem., [2]Tokyo Univ. of Agric.)

【背景・目的】NAFLD（非アルコール性脂肪肝疾患）は肝硬変、肝不全、更には肝臓がんへ発展する恐れがある疾患であるため、その予防は早急に取り組むべき課題である。我々は様々な健康効果が期待されている玄米に着目し、実験動物を用いて NAFLD に及ぼす影響を検討した。その結果、玄米が NAFLD 発症予防作用を有することが示された。また、肝臓の遺伝子発現量を解析したところ、ビタミン A 代謝に関連する RALDH（レチノイン酸合成酵素）及び RARβ（レチノイン酸受容体β）が玄米摂取により増加していた。さらに RARβの下流に存在する転写因子 PPARαやβ酸化律速酵素 CPT1a も玄米の摂食により増加した。これらの結果から、玄米摂取による NAFLD 発症予防メカニズムの一つとして、肝臓におけるビタミンA代謝の亢進が示唆された。しかし、ビタミンA代謝を亢進させる玄米成分は不明である。そこで本研究はビタミン A 代謝を亢進させる玄米成分を探索し、その成分が NAFLD 発症予防効果を有するか解明することを目的とする。
【実験内容】玄米の脂溶性成分を有機溶媒にて抽出した玄米抽出物を Huh-7 細胞（ヒト肝がん由来細胞）に添加し、real-time PCR を用いて RALDH、RARβ、CPT1a の遺伝子発現量を解析した。
【結果】抽出物を Huh-7 細胞に添加すると、RALDH、RARβ、CPT1a の遺伝子発現量は増加した。今後の実験では抽出物の分画によるビタミン A 代謝亢進効果のある玄米成分の特定及び玄米による NAHLD 発症予防メカニズムの解明を目指す。

Dietary intervention is one of the strategies in prevention of NAFLD development. Previous our study indicated to the brown rice consumption prevented NAFLD development. In addition, we showed that gene expression levels of RALDH (retinoic acid synthase) and RARβ (retinoic acid receptor beta), which are related to vitamin A metabolism, were increased by the brown rice consumption. These results suggest that one of the prevention mechanisms of NAFLD development in brown rice is to enhance the vitamin A metabolism. The purpose of the present study is to elucidate whether lipid fraction of brown rice enhance the vitamin A metabolism, and prevent on NAFLD development. Treatment of lipid fraction of brown rice to huh-7 cells (human hepatoma-derived cells) increased gene expression of RALDH, RARβ and CPT1a.

NAFLD, Brown rice, Vitamin A

講演番号：3C03-09
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:00～ ミーティングルーム C

野沢菜漬け由来乳酸菌 N-07 株と野沢菜粉末による肥満抑制効果の解析

Anti-obesity effect of *Brassica rapa* L. pickled-derived lactic acid bacteria N-07 strain and *Brassica rapa* L.

○田中 佑奈、澤 陶有子、中嶋 茜、浅見 拓哉、遠藤 勝紀、吉倉 陽華、松井 莉奈、田中 沙智（信州大農）
○Yuna TANAKA, Toko SAWA, Akane NAKASHIMA, Takuya ASAMI, Katsunori ENDO, Haruka YOSHIKURA, Rina MATSUI, Sachi TANAKA (Shinshu Univ.)

信州伝統野菜の一つである野沢菜は、葉と茎を塩漬けにした野沢菜漬けとして昔から食されている。当研究室では、野沢菜漬けから 223 株の乳酸菌を単離し、その中で *Lactobacillus plantarum* Shinshu N-07(N-07)株に抗肥満効果があることを見出した。また、食物繊維が豊富に含まれている野沢菜にも肥満を改善する効果が予想され、N-07 株と野沢菜の併用摂取により、抗肥満効果が高まることが期待される。そこで本研究では、食餌誘導性肥満モデルマウスを用いて、N-07 株と野沢菜の単独あるいは併用摂取による肥満改善効果とそのメカニズムについて明らかにすることを目的とした。ウエスタンダイエットに N-07 株と野沢菜粉末をそれぞれ添加し、マウスに 8 週間摂取させたところ、脂肪組織重量と肝臓中の脂質が有意に低下した。また、N-07 株と野沢菜粉末の併用摂取により、体重増加が有意に抑制された。さらに、野沢菜粉末の摂取によって糞中のコレステロールが増加した。そこで、コレステロールの吸着能について *in vitro* の実験を用いて検証したところ、野沢菜粉末はコレステロールに吸着することが示された。以上のことから、N-07 株と野沢菜粉末の併用摂取によって肥満抑制効果の増強が確認でき、野沢菜粉末がコレステロールに吸着し、排出を促すことが示された。

Brassica rapa L. is a leafy green vegetable known as Nozawana in Japan, and its leaves and stalks are processed mainly into pickled products called Nozawana-zuke, which are local specialities in Nagano area. We have previously shown that *Lactobacillus plantarum* Shinshu N-07 (N-07) strain isolated from fermented *B. rapa* L. has anti-obesity effect in a mouse model of high fat diet-induced obesity. Since high levels of dietary fiber are contained in *B. rapa* L., we speculated that N-07 intake in combination with *B. rapa* L. would enhance the anti-obesity effect. In the present study, we analyzed the anti-obesity effect of N-07 and *B. rapa* L. using diet-induced obesity model mice. Adipose tissue weight and liver cholesterol were significantly lower in mice fed the western diet supplemented with N-07 or *B. rapa* L. compared with those fed the western diet. In addition, N-07 intake in combination with *B. rapa* L. significantly suppressed body weight gain. Furthermore, the amount of excreted cholesterol was significantly increased by feeding with *B. rapa* L. which exhibited the cholesterol-binding ability *in vitro* experiment. These results suggest that N-07 intake in combination with *B. rapa* L. would enhance the anti-obesity effect by increasing cholesterol-binding ability and cholesterol excretion.

anti-obesity effect, lactic acid bacteria, *Brassica rapa* L.

発表責任者：田中沙智（tanakasa@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：3C03-10
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:00～ ミーティングルーム C

アントシアニン類によるスフィンゴシンキナーゼ発現制御に関する研究

Regulation of sphingosine kinase expression by anthocyanins

○上野 有紀[1]、加藤 結衣[1]、杉山 遥香[1]、中野 未紗樹[1]、川本 善之[2]、大澤 俊彦[1] ([1]愛知学院大心身科学、[2]中部大生命健康)
○Yuki UENO[1], Yui KATO[1], Haruka SUGIYAMA[1], Misaki NAKANO[1], Yoshiyuki KAWAMOTO[2], Toshihiko OSAWA[1] ([1]Aichi Gakuin Univ., [2]Chubu Univ.)

スフィンゴシンキナーゼ（SphK）は、さまざまな成長因子やサイトカインなどによる刺激により活性化し、スフィンゴシン 1 -リン酸（S1P）を生成する。肥満では血漿中の S1P 濃度が高値となることが知られているが、肥満における S1P の役割は未知な点が多い。我々は、SphK の発現を調節する食品因子の探索を培養細胞によるモデル系を用いて行い、アントシアニン類が持つ活性に着目した。マウス由来前駆脂肪細胞株 3T3-L1 細胞を、分化誘導剤（インスリン、デキサメタゾン、3－イソブチル－1－メチルキサンチン）により分化誘導し、インスリン含有培地にて培養後の細胞を実験に用いた。各種アントシアニン類とマウス由来 TNF-α を組み合わせて培養後、SphK1 および 2 の遺伝発現をリアルタイム PCR 法により測定した。各種アントシアニン類のうち、ペチュニジン、ペオニジン、マルビジンは、SphK1 の発現を定常化することを見出した。本講演では、構造活性相関についても報告したい。

Sphingosine kinase (SphK) is activated by stimulation with various growth factors and cytokines to produce sphingosine-1-phosphate (S1P). It is known that the S1P concentration in plasma is high in obesity, however the role of S1P in obesity remains unclear. We investigated food factors that regulate the expression of SphK using cultured cells and focused on the activity of anthocyanins. Mouse-derived preadipocyte line 3T3-L1 cells were induced to differentiate with a differentiation-inducing agent (insulin, dexamethasone, 3-isobutyl-1-methylxanthine), and the cells after culturing in an insulin-containing medium were used in the experiment. After culturing a combination of various anthocyanins and mouse-derived TNF-α, the expression of SphK1 and 2 was measured by real-time PCR. Among various anthocyanins, petunidin, peonidin, and malvidin have been found to abrogate the expression of SphK1. In this study, we would like to report on the structure-activity relationship.

anthocyanin, sphingosine kinase, inflammation

発表責任者：上野有紀（ueno@dpc.agu.ac.jp）

講演番号：3C03-11
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:00～ ミーティングルーム C

腸内環境および免疫機能に及ぼすあまおう乳酸菌およびフコイダンの摂食効果

The effect of *Lactobacillus plantarum* AMAOU and Fucoidan on gut microbiota and immune function of mice

○篠田 あかり[1]、朴 俊夏[1]、中野 勇人[3]、柴崎 哲哉[3]、宮﨑 義之[1,2]、中山 二郎[1]([1]九大院農、[2]NPO フコイダン研究所、[3](株)ヴェントゥーノ)
○ Akari SHINODA[1], Juneha BAK[1], Hayato NAKANO[3], Tetsuya SHIBASAKI[3], Yoshiyuki MIYAZAKI[1,2], Jiro NAKAYAMA[1] ([1]Department of Bioscience and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Kyushu Univ., [2]NPO Research Institute of Fucoidan, [3]Ventuno Co., LTD.)

【背景】*Lactobacillus plantarum* AMAOU は福岡県特産のいちご品種「あまおう」から分離された、マクロファージ様細胞株の活性化作用をもつ乳酸菌である。また、我々は、褐藻類に含まれる高分子硫酸化多糖のフコイダンに注目し、抗腫瘍作用や免疫賦活作用など多くの健康効果を明らかにしてきた。本研究では、それらによる腸内フローラの改善ならびに免疫機能の亢進に関する作用機構の解明を目的とした。
【方法】*L. plantarum* AMAOU 加熱死菌体粉末およびオキナワモズク由来フコイダンエキス末を対象に、雄性 Balb/c マウスを用い、対照食群（C 群）、2% *L. plantarum* AMAOU 添加食群（L 群）、2%フコイダン添加食群（F 群）および *L. plantarum* AMAOU＋フコイダン両添加食群（L+F 群）の 4 群各 6 匹で摂食実験を行った。各群マウスに対してがん抗原による免疫処置を施し、摂食終了後に抗腫瘍免疫系の活性化指標を測定するとともに、摂食期間中に回収した糞便を用いて、次世代シーケンサーによる腸内フローラの解析を行った。
【結果・考察】腸内フローラ解析の結果、L 群において、肥満マウスに多いとされる *Turicibacter* 属の増殖が抑制されるとともに、Treg 誘導活性が知られる *Clostriales* 目の増加がみられた。また、F 群と L+F 群において、抗腫瘍効果との関係が報告されている *Akkermansia* 属が増殖していた。他方、抗腫瘍免疫指標については、各試験食摂取群において、ナチュラルキラー細胞および細胞傷害性リンパ球の活性化を認めた。以上により、*L. plantarum* AMAOU およびフコイダンは、腸内フローラ改善作用を有し、抗腫瘍免疫の増強に寄与することが示唆された。
【Background】 Here we address the mechanism of the enhancement of immune function through the improvement of intestinal flora by *Lactobacillus plantarum* AMAOU isolated from Fukuoka brand strawberry “AMAOU” and *Okinawa-mozuku* fucoidan which is fucose-enriched sulfated polysaccharides.
【Method】 Feeding experiment was performed with 6 Balb/c mice in each of 4 groups: Control diet group (C group), *L. plantarum* AMAOU diet group (L group), Fucoidan diet group (F group), and *L. plantarum* AMAOU + Fucoidan diet group (L+F group). The activity of the antitumor immune system was observed and the intestinal flora was analyzed by next-generation sequencer.
【Result and Discussion】 By intestinal flora analysis, in L group, *Turicibacter* which is abundant in obese mice decreased and *Clostridiales* which is known to Treg-inducing activity increased. In F and L+F group, *Akkermansia* which enhances the antitumor effect increased. As for immunological index, activation of natural killer cells and cytotoxic lymphocytes was observed in each experimental group. These results suggest *L. plantarum* AMAOU and Fucoidan enhance antitumor immunity through improvement of intestinal flora.

Lactobacillus plantarum AMAOU, Fucoidan, Gut microbiota and Immune function

発表責任者：中山二郎（nakayama@agr.kyushu-u.ac.jp）

講演番号：3C03-12
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:00～ ミーティングルーム C

腸炎モデルマウスにおける脳での炎症に対するカルノシン酸の影響

Effect of carnosic acid on brain inflammation in colitis model mice

○海野 美月[1]、海切 弘子[2]、萱島 知子[3]、柴田 紗知[4]、松原 主典[1,5] ([1]広大院教育、[2]広島文化学園大、[3]佐賀大教育、[4]福山大薬、[5]広大院人間)
○ Mitsuki UMINO[1], Hiroko KAIKIRI[2], Tomoko KAYASHIMA[3], Sachi SHIBATA[4], Kiminori MATSUBARA[1,5] ([1]Hiroshima Univ. Educ., [2]Hiroshima Bunka Gakuen Univ., [3]Saga Univ., [4]Fukuyama Univ., [5]Hiroshima Univ.)

腸の状態が全身に影響を与えることが知られており、脳での炎症との関係も注目されている。また、脳での炎症にはミクログリアが重要な役割を果たしていることが明らかとなってきている。我々はローズマリーに含まれる機能成分カルノシン酸（carnosic acid：CA）の脳における抗炎症効果について研究を進めている。本研究では、デキストラン硫酸ナトリウム(dextran sulfate sodium：DSS)を用いた急性大腸炎モデルマウスにおける脳での炎症への効果について検討した。7 週齢の BALB/c 雄マウスを 1 週間予備飼育した後、DSS 非投与群(Control 群)、2% DSS を投与した群(DSS 群)、2% DSS と CA 溶液を投与した群(CA 群)に分け、蒸留水もしくは DSS 水溶液を飲用水として 14 日間自由摂取させた。試験期間中、便を観察し，DAI（Disease Activity Index）によってスコア化し，組織化学染色とあわせて腸の状態について評価した。9、10 週齢時には行動試験（強制水泳試験,明暗箱試験）を行い抗不安・うつ効果について検討した。脳については、ミクログリアの活性化・非活性化を形態的に評価するとともに、神経細胞との接触状況について評価を行った。その結果、CA 群では DSS 群に比べ DAI スコアはあまり改善しなかったものの組織の損傷は比較的少なく、腸の炎症が抑制されていた。行動試験では、明暗箱試験の抗不安効果の指標になる明所潜在時間の変化は見られなかった。しかしながら、強制水泳試験の抗うつ効果の指標となる不動時間については、CA 群では DSS 群よりも短くなっていた。脳の炎症の指標となるミクログリアの活性化については、CA 群では DSS 群よりも活性化ミクログリアが少なかった上、脳機能保護作用の指標となることが示唆されているミクログリアと脳神経細胞の接触面の長さについては、DSS 群に比べ CA 群では長い傾向にあった。これらの結果は、DSS 誘発性大腸炎の脳における炎症に対しても、CA はミクログリアを介して炎症を抑制し，神経細胞を保護する可能性を示唆する。

Carnosic acid (CA) is a major bioactive compound in rosemary. CA activates NRf2 signal pathway and exerts cytoprotective effects. In this study, we examined whether CA affected brain inflammation in colitis model mice. CA moderately protected the colon against dextran sulfate sodium (DSS) induced colitis. CA also exerted a moderate anti-depression like effect in a forced swim test. Activated microglia decreased and microglial coverage of neurons increased in the brain of CA intake mice. These results suggest that CA might prevent colitis-induced brain inflammation.

Carnosic acid, Microglia, Inflammation

発表責任者：松原主典（kmatsuba@hiroshima-u.ac.jp）

講演番号：3C03-13
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:00～ ミーティングルーム C

メスマウスにおけるダイゼインによるヒラメ筋の肥大促進における *S*-エクオールの関与

Involvement of *S*-equol in daidzein-induced hypertrophy of soleus muscle in female mice

○佐々木 里那、河田 夏初、原田 直樹、山地 亮一（大阪府大院　生命環境）
○Rina SASAKI, Natsuha KAWATA, Naoki HARADA, Ryoichi YAMAJI (Osaka prefecture Univ.)

【目的】大豆イソフラボンの一種であるダイゼイン（4',7-dihydroxyisoflavone）をメスマウスに摂取させるとヒラメ筋において筋線維の断面積が増大し, 筋重量が増加することを見出した[1)]。摂取されたダイゼインの一部は腸内細菌によって *S*-エクオール（4',7-isoflavandiol）へと代謝される。本研究ではダイゼインによるヒラメ筋重量の増加における *S*-エクオールの関与とその分子機構を検討することを目的とした。

【方法・結果】ダイゼインをカナマイシンとともに C57BL/6J メスマウスに摂取させたところ，ダイゼインによるヒラメ筋の筋肥大促進と筋重量増加が抑制された。マウス由来 C2C12 筋芽細胞を筋管細胞へと分化させた後，*S*-エクオール存在下で培養したところ筋管細胞は肥大したが，エストロゲン受容体（ER）アンタゴニスト（ICI182,780）よって *S*-エクオールによる肥大効果は抑制された。さらに C2C12 筋管細胞は ERβ アゴニスト（DPN）によって肥大したが，ERα アゴニスト（PPT）によって影響を受けなかった。*S*-エクオールと DPN は骨格筋でのタンパク質合成の主要なシグナル伝達経路である mTOR シグナルの下流に位置する p70S6K のリン酸化を促進した。これらの結果から，ダイゼインの代謝物である *S*-エクオールが ERβ を介して mTOR シグナルを活性化し，タンパク質合成を促進することで筋肥大を誘発すると推測された。

【Purpose】 We have reported that oral administration of the soy isoflavone daidzein induces hypertrophy of the soleus muscle of female mice[1)]. Some of the ingested daidzein is metabolized to *S*-equol by intestinal bacteria. The purpose of this study was to investigate whether *S*-equol is involved in daidzein-induced soleus muscle hypertrophy, and if so, its molecular mechanism.

【Methods and Results】 When daidzein was orally administered to C57BL/6J female mice with kanamycin, daidzein-induced soleus muscle hypertrophy was inhibited. When murine C2C12 myoblasts were differentiated into myotubes and were cultured in the presence of *S*-equol, the myotube diameter was increased. However, the estrogen receptor (ER) inhibitor ICI182,780 inhibited *S*-equol-induced increases in myotube diameter. The ERβ agonist (DPN), but not ERα agonist (PPT), induced myotube hypertrophy. *S*-Equol and DPN promoted the phosphorylation of p70S6K, which is downstream of mTOR signaling. These results suggest that *S*-equol, a metabolite of daidzein, induce muscle hypertrophy by activating mTOR signal pathway via ERβ.

1) Ogawa M, Kitano T, Kawata N, et al., *J. Nutr. Biochem*. (2017) **49**, 63-70

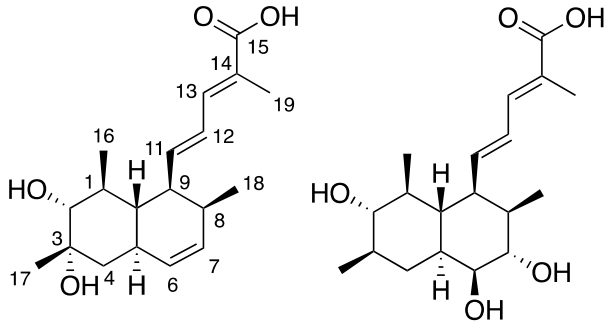
skeletal muscle, *S*-equol, daidzein

講演番号：3C05-01
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 11:00～ ミーティングルーム C

Two new octahydronaphthalene derivatives, trichodermic acid C and D produced by *Trichoderma* sp. HN-1.1

○Ferry Ferdiansyah Sofian[1,2], Fatimah Ayu Warahapsari[3], Takuya Koseki[4], Yoshihito Shiono[4]
([1]The United Graduate School of Agricultural Sciences, Iwate University, [2]Faculty of Pharmacy, Universitas Padjadjaran, [3]Faculty of Forestry, Universitas Gadjah Mada, [4]Faculty of Agriculture, Yamagata University)

Trichodema species as the endophytic fungi are known for their diverse bioactivity owing to the production of abundant secondary metabolites which have been isolated and characterized. One of the metabolite was trichodermic acid isolated from *Trichoderma spirale*, which performed significant antifungal activity against *Candida albicans* and *Colletotrichum gloeosporioides*. Moreover, this trichodermic acid isolated from other fungus *Penicillium ochrochloronthe* exhibited the antimicrobial activity selectively against tested fungal and bacterial strains and exhibited moderate cytotoxicity against five human cancer cells (A549, LN229, MGC, LOVO, and MDA231). In this study, we aimed to investigate the metabolites from the endophytic strain *Trichoderma* sp. HN-1.1 isolated from unidentified dead woody twigs collected from Mt. Gassan, Yamagata Prefecture, Japan. Two new octahydronaphthalene derivatives, trichodermic acid C (**1**) and trichodermic acid D (**2**), along with a known analog, trichodermic acid (**3**), trichodermic acid A (**4**) and trichodermic acid B (**5**), were isolated from the ethyl acetate extract of an endophytic strain *Trichoderma sp.* HN-1.1. The structures of compounds **1** and **2** were elucidated on the basis of spectroscopic methods including UV, IR, HRESITOFMS, ECD, 1D and 2D NMR data.



1 **2**

Octahydronaphthalene derivatives, trichodermic acid C and D, *Trichoderma* sp.

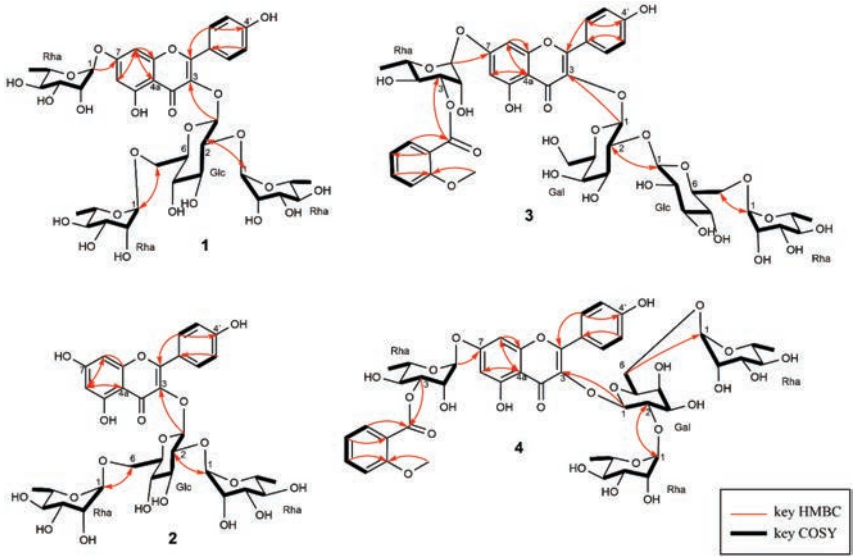
発表責任者：Yoshihito Shiono（yshiono@tds1.tr.yamagata-u.ac.jp）

講演番号：3C05-02
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 11:00～ ミーティングルーム C

Flavonol Glycosides from Jack Bean (*Canavalia ensiformis* (L.) DC: Identification and α-Glucosidase Inhibition Characteristic

○ Anita Maya SUTEDJA[1,2,3], Emiko YANASE[1], Irmanida BATUBARA[2], Dedi FARDIAZ[2], Hanifah Nuryani LIOE[2] ([1]Gifu University, [2]IPB University, [3]Widya Mandala Catholic University Surabaya)

Jack bean (*Canavalia ensiformis* (L.) DC.) is one of the legume plants cultivated in Indonesia and other parts of East Asia. Although an underutilized tropical legume, the beans can potentially decrease the risk of several chronic diseases. Saponins, flavonoids, and alkaloids already known contained in this bean, nevertheless, not much effort has been directed at profiling the polyphenolics contained therein. Hence, this work aimed to identify and quantify the dominant jack bean polyphenolics, which are believed to have antioxidant and other bioactivities, mainly its potency as an antidiabetic. Four major compounds were detected and identified as kaempferol glycosides with three or four glycoside units, established based on UV-visible, 1D, 2D NMR, and HR-ESI-MS analyses. Kaempferol 3-O- α -l-rhamnopyranosyl (1→6) β -d-glucopyranosyl (1→2)- β -d-galactopyranosyl-7-O-[3-O-*σ*anisoyl]- α -l-rhamnopyranoside was found for the first time, while the other three compounds have already been described previously in plants other than jack bean. The presence of anisoyl in the structure made this new compound had higher α-glucosidase inhibition activity compared to acarbose, therefore can be a potential antidiabetic agent.



Canavalia ensiformis, flavonol glycosides, constituent profiling

発表責任者：Emiko YANASE（e-yanase@gifu-u.ac.jp）

講演番号：3C05-03
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 11:00～ ミーティングルーム C

Squalene novel cyclic peroxides detected on the human skin in vivo and cause damage to basal and differentiated keratinocytes in vitro (HaCaT model).

○Saoussane Khalifa[1], Shunji Kato[1], Masaru Enomoto[2], Yurika Otoki[1], Takahiro Eitsuka[1], Kiyotaka Nakagawa[1] ([1]Food and Biodynamic Chemistry Laboratory, Tohoku Univ., [2]Applied Bioorganic Chemistry Laboratory, Tohoku Univ.)

Introduction: Among skin surface lipids, squalene (SQ) is a major component that is readily oxidized upon exposure to UV light or other environmental stressors, to form 6 monohydroperoxide isomers (SQ-OOH) as the primary oxidation products. Due to the instability of the latter, they are suspected to easily turn into secondary oxidation products, of which, the exact structure and effect on the skin are unknown. We recently reported the formation of a novel cyclic peroxide (2-OOH-3-(1,2-dioxane)-SQ) resulting from one specific isomer (6-OOH-SQ)[1]. However, the secondary oxidation products resulting from each individual isomer, the mechanism involved in their formation, and their presence and effect on the skin haven't been reported. This issue was the basis of the study reported herein.

Methods: Individual SQ-OOH isomers were synthesized through photooxidation of SQ, separated using semi-preparative HPLC, reacted with 2-methoxypropene, then subjected to multiple semi-preparative HPLC purifications. Secondary oxidation products of individual SQ-OOH isomers were studied by subjecting each isomer to a second oxidation in various conditions (singlet oxygen oxidation, autoxidation under thermal conditions, and photooxidation), the structure of the main observed compounds was studied using mainly LC-MS/MS and derivatization reactions. The presence on the skin of the main secondary oxidation products observed in vitro was verified by LC-MS/MS after sampling of skin lipids from healthy volunteers.

HaCaT cells were grown either in low or high calcium medium to generate basal and differentiated keratinocytes. Both were treated with SQ-OOH and SQ main secondary oxidation product, their uptake, the changes in the expression of inflammatory genes, and differentiation genes were carried out.

Results: When individual SQ-OOH isomers were oxidized, cyclic peroxides (1,2-dioxanes) were noticed to be the main secondary oxidation products formed, following the same mechanism observed in the formation of (2-OOH-3-(1,2-dioxane)-SQ). The presence of (2-OOH-3-(1,2-dioxane)-SQ) and the cyclic peroxides deriving from 10-OOH-SQ were the most prominent in the human skin. The uptake test by HaCaT cells revealed the absence of SQ-OOH in the cells, but the presence of SQ cyclic peroxides inside the cells. Similarly, the cyclic peroxides showed a bigger impact on the expression of inflammatory genes and differentiation.

1)Khalifa S., *et al.* 2020, The 59th Annual Meeting of the Japan Oil Chemists' Society.

Squalene oxidation, Cyclic peroxides, Skin

講演番号：3C05-05
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 11:00～ ミーティングルーム C

A new approach for effective co-production of 3-hydroxypropionic acid and 1,3-propanediol

○ Mohammad Mojarrad[1], Takahisa Tajima[2], Akiko Hida[2], Junichi Kato[2] ([1]Department of Molecular Biotechnology, Graduate School of Advanced Sciences of Matter, Hiroshima University, Kagamiyama Higashi-Hiroshima, Hiroshima, Japan, [2]Program of Biotechnology, Graduate School of Integrated Sciences for Life, Hiroshima University, Kagamiyama Higashi-Hiroshima, Hiroshima, Japan)

3-Hydroxypropionic acid (3-HP) and 1,3-propanediol (1,3-PDO) have a tremendous potential market in several industries. This study evaluates the simultaneous bioproduction of 3-HP and 1,3-PDO, using the new Psychrophile-based Simple bioCatalyst (PSCat) reaction system.

The new method of PSCat is based on the expression of glycerol dehydratase (DhaB), 1,3-propanediol dehydrogenase (DhaT), and aldehyde dehydrogenase (PuuC) from *Klebsiella pneumoniae* in the psychrophilic host bacteria, individually. *Shewanella livingstonensis* Ac10 and *Shewanella frigidimarina* DSM 12253 was chosen as a psychrophilic host bacteria. Heat treatment at 45°C for 15 min deactivated the intracellular psychrophilic metabolic flux. The production process was started after adding adequate amounts of a substrate, cofactor, and coenzyme. The DhaB and DhaT, involved in the metabolic pathway of 1,3-PDO production.

The 1,3-PDO productivity after individual genes expression at 40°C was around 25.8 mM. The DhaB and PuuC, involved in the metabolic pathway of 3-HP production. The productivity of 3-HP was 60.6 mM after individual gene expression in the psychrophilic host bacterium. Three enzymes (DhaB, DhaT, and PuuC) were expressed individually in both *S. livingstonensis* Ac10 and *S. frigidimarina* DSM 12253 as host bacteria. The same condition (45°C for 15 min) was used to inactivate the psychrophilic hosts' intracellular metabolic flux. The ratio of 4:2:1 was chosen for Ac10-B:Sf-U:Sf-T, respectively. We also added 30 mM glycerol as a substrate and adjusted the vitamin B_{12} concentration to the new volume. After one hour, for the control group, we added only more cell suspensions. After 60 min and mixing, 3-HP and 1,3-PDO production reached approximately 30 mM and 16 mM in both control and reaction tubes, respectively. Production increased for both compounds, reaching 48.3 mM for 3-HP and 24.3 mM for 1,3-PDO in the reaction tube to which we added more substrates and adjusted vitamin B_{12} concentration after 120 min. Simultaneously, no increase was observed in the control group. Hence, the feasibility of the individual production and the simultaneous biosynthesis system were verified in the new PSCat approach.

Psychrophile-based Simple bioCatalysts, 3-hydroxypropionic acid, 1,3-propanediol

発表責任者：Junichi KATO（jun@hiroshima-u.ac.jp）

講演番号：3C05-06
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 11:00～ ミーティングルーム C

Biosynthesis of the nucleoside-derived natural product angustmycin

○Jiaqi XIA[1], Taro SHIRAISHI[1], Tomohisa KUZUYAMA[1,2] ([1]GSALS, UTokyo, [2]CRIIM, UTokyo)

The nucleosides act as various roles in most primary metabolisms, including as energy donors, co-factors, and metabolite carriers, like ATP, cAMP and ppGpp. Besides, there are several nucleoside-containing natural products in nature. Because they are analogous to primary metabolites, they often show unique bioactivity. Thus, these compounds have inspired organic chemists and chemical biology communities to seek for the development of novel approaches to assemble novel molecules that might be an enzyme inhibitor or an antibiotic. Successive modifications of nucleosides are indispensable for synthesizes of such sophisticated molecules. To achieve this challenging task, we focused on the biosynthetic enzymes involved in nucleoside antibiotics.

Angustmycin (AGM) A and C are nucleoside antibiotics extracted from the culture broth of the actinomycetes *Streptomyces angustmyceticus* [1]. AGMs are adenosine analogs containing an additional hydroxymethyl group at C1' (1'-branched ribonucleoside). In addition, AGM A contains characteristic ribose with 5'-deoxy-4',5'-ene group called *exo*-glycal. We previously reported the biosynthetic gene cluster for AGMs named *agm* cluster [2]. However, the detail of the biosynthetic pathway has remained largely elusive. Based on feeding experiments [3] and *in silico* analyses of the *agm* cluster, we predicted the biosynthetic pathway. Thus, we aimed to reconstitute this biosynthetic pathway *in vitro* to confirm our hypothesis.

Using recombinant enzymes Agm3, 4 and 5 with fructose 6-phosphate and adenine as substrates, we successfully obtained phospho-AGM C *in vitro*. This result gave us further insight into the biosynthesis of AGMs. In addition, we attempted to utilize these enzymes to exploit novel artificial nucleoside analogs. We will also report chemo-enzymatic synthesis of nucleoside analogs using promiscuous enzyme Agm6 that is responsible for the formation of *exo*-glycal in AGM A biosynthesis. These results will provide a theoretical basis and experimental methods for further chemoenzymatic synthesis.

[1] H. Yuntsen *et al. J. Antibiot*. 9:195 (1956).

[2] T. Shiraishi *et al*. The 34th Annual Meeting of SAJ (2019)

[3] T. Sugimori and R. Suhadolnik, *J. Am. Chem. Soc*. 87:1136–1137 (1965).

chemoenzymatic synthesis, nucleoside antibiotic, Streptomyces

講演番号：3C05-07
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 11:00～ ミーティングルーム C

Studies on the biosynthetic machinery in secondary metabolism of *Streptomyces* to form 1-azabicyclo[3.1.0]hexane ring via aziridine ring

○Sumire KUROSAWA[1], Kenichi MATSUDA[1], Fumihito HASEBE[1], Takeo TOMITA[1,2], Tomohisa KUZUYAMA[2,3], Saori KOSONO[1,2], Makoto NISHIYAMA[1,2] ([1]BRC, UTokyo, [2]CRIIM, UTokyo, [3]Grad. Sch. Agri. & Life Sci., UTokyo)

1-Azabicyclo[3.1.0]hexane ring (azabicyclo hexane ring) is a key moiety of azinomycin B and ficellomycin for their biological activity against bacteria, fungi, and tumor through DNA alkylation. Although these compounds are expected for pharmaceutical use, their biosynthetic pathways are still unclear, which makes it difficult to explore and create more effective azabicyclo hexane ring-containing natural products. Recently, we found vazabitide A as a novel azabicyclo hexane ring-containing natural product from *Streptomyces* sp. SANK 60404. Our previous studies revealed that tazabicyclo hexane ring-containing amino acid in vazabitide A is formed from the novel non-proteinogenic amino acid, (2*S*,6*R*)-diamino-(5*R*,7)-dihydroxy-heptanoic acid (DADH). In this presentation, we will report successful identification of the genes necessary for forming an aziridine ring and discuss the biosynthetic mechanism toward the azabicyclo hexane ring formation.

The biosynthetic gene clusters for azinomycin B, ficellomycin, and vazabitide A have already been determined as the *azi*, *fic,* and *vzb* clusters. Comparison of genes among these clusters revealed that several homologs were conserved in all the gene clusters in addition to the putative DADH biosynthetic genes. We hypothesized that they were involved in the formation of the azabicyclo hexane ring from DADH.

We have especially focused on hypothetical genes, *vzb10* and *vzb11*, both of which encode proteins with no similarity in amino acid sequence to those of previously known enzymes. Disruption of the *vzb10* or *vzb11* gene in SANK 60404 strain resulted in a loss of vazabitide A production, while DADH was accumulated in the mutants. This result indicates that the *vzb10* and *vzb11* genes are involved in forming of the azabicyclo hexane ring. In all the *azi*, *fic*, and *vzb* clusters, the *vzb10* homologs are adjacent to the *vzb11* homologs. A pull-down assay for recombinant enzymes of Vzb10 and Vzb11 showed that Vzb10 and Vzb11 interacted with each other to form a complex, presumably for a certain important reaction. In the supernatant of *vzb10*-knockout mutant, a compound with the mass for *N*-acetyl-sulfo-DADH was observed, which is consistent with our previous studies suggesting that DADH is sulfonated at first. We purified this compound and used as a substrate for *in vitro* assay of Vzb10/11. As a result, putative *N*-acetyl-sulfo-DADH was converted into compound X with an aziridine ring only when both Vzb10 and Vzb11 were present. Thus, Vzb10/11 has become the first enzymes shown to catalyze the aziridine ring formation. Recently, we have successfully determined the crystal structure of Vzb10/11 homolog proteins and now proceed to the elucidation of the detailed reaction mechanism of Vzb10/11.

biosynthesis, natural product, ring formation

発表責任者：西山真（umanis@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号:3C05-08
質疑応答日時、会場:3 月 20 日 11:00～ ミーティングルーム C

Antibacterial, Antihyperuricemia, α-Amylase and α-Glucosidase Inhibitory Activities of of Celastrus hindsii. B

○VIET TRAN, Tran Dang Xuan (Hiroshima Univ.)

Abstract: *Celastrus hindsii* is traditional medicinal plant in South China and Southeast Asia. In this study, *C. hindsii* leaves were separated in solvents with different concentrations. After that antibacterial potential of fractions and extracts were evaluated by 4 types of bacteria including *Bacillus subtilis, Klebsiella pneumonia, Staphylococcus aureus, and Escherichia coli*. The results showed that fraction V10 obtained from the $CHCl_3$: MeOH (8:2) dilution was the maximal in antibacterial. In addition, antihyperuricemia, α-Amylase and α-Glucosidase inhibitory activities were also evaluated. Ethyl acetate was the most potent extract of activities. Meanwhile, V5 in $CHCl_3$: MeOH (99:1) flask 61-80 was the most potent fraction in antihyperuricemia, α-Glucosidase and α-Amylase inhibitory potential. On the other hand, GC-MS and ESI-MS results also indicated compounds in fractions. The content of compounds has also been quantified. Specifically, the appearance of pamitic acid was found in fraction V10 with 13.09% and fucosterol with 43.62% in fraction V5, are compound plays an important role of activities in fractions. This research has opened up a potential development direction for *C.hindsii* to become a source of valuable medicinal and functional food production.

6868, 5858, 2828

発表責任者：TRAN DUC VIET (tranducviet6868@gmail.com)

講演番号：3C05-09
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 11:00～ ミーティングルーム C

Mung bean peptides promote translocation of glucose transporter 4 and glucose uptake through AMPK-, JAK/STAT- and Insulin-pathways in skeletal muscle cells

○Qing ZHANG, Yoko YAMASHITA, Hitoshi ASHIDA (Kobe Univ.)

[Purpose] Mung bean proteins were reported to prevent hyperglycemia. We previously isolated HTL, FLSSTEAQQSY, and TLVNPDGRDSY from mung bean proteins as the effective peptides to promote glucose uptake into the skeletal muscle cells. Since glucose transporter 4 (GLUT4) plays a pivotal role in regulating glucose transport, we investigated that the underlying mechanisms of GLUT4 translocation in the skeletal muscle cells.

[Methods] These peptides were treated to L6 myotubes for 4 hours with or without various inhibitors and measured glucose uptake. Under the same conditions, GLUT4 translocation to the plasma membrane and its related signaling molecules were examined by western blotting.

[Results] In L6 myotubes, the mung bean peptides at 1 mM significantly promoted glucose uptake accompanied by GLUT4 translocation. Regarding the mechanism of GLUT4 translocation, these peptides increased phosphorylation of AMPK, IR, PI3K, aPKC, Akt, JAK2, and STAT5. HTL-increased glucose uptake was inhibited by an inhibitor of peptide/histidine transporter 1. Thus, these peptides activated AMPK-, JAK/STAT- and Insulin-pathways in skeletal muscle cells and might prevent hyperglycemia through increasing glucose uptake and GLUT4 translocation.

mung bean peptides, glucose transporter 4, skeletal muscle

講演番号：3C05-10
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 11:00～ ミーティングルーム C

Fermented rice bran supplementation promoted intestinal restoration post DSS-induced inflammation

○Afifah Zahra Agista[1], Jahidul Islam[1], Takuya Koseki[2], Yusuke Ohsaki[1], Michio Komai[1], Hitoshi Shirakawa[1] ([1]Grad. Sch. Agri. Sci., Tohoku Univ., [2]Fac. Agri., Yamagata Univ.)

Introduction: Fermented rice bran (FRB) is known to contain various bioactive compounds which were suggested to play a role in FRB function in protecting mice intestine against dextran sodium sulfate (DSS)-induced inflammation. However, whether FRB supplementation could restore the intestinal homeostasis after inflammation occurred was still unknown. The current research observed the effect of FRB supplementation in intestinal restoration and the development of intestinal fibrosis after intestinal inflammation was induced by DSS.

Method: DSS (1.5%) was introduced in mice (total 56 C57BL/6 female mice, 10-11 weeks old) drinking water for 5 days. Eight mice were sacrificed right after the DSS treatment ended. The remaining mice were divided into three groups. Each groups were given different types of diet: control diet, 10% RB supplemented diet, and 10% FRB supplemented diet. Diet treatment was continued for two weeks, after which half of the mice population from each groups were sacrificed. Eight mice that were left from each groups were continued to be fed by the experimental diet for another 3 weeks before finally being sacrificed.

Results: Body weight reduction began 7 days after DSS treatments were started. Diet treatment did not affect mice body weight. Disease activity index (DAI) scores began to increase 2 days after DSS treatment started, and persisted for 5 weeks after the treatment was stopped. FRB supplementation was shown to lower DAI scores. It also reduces the mRNA level of several pro-inflammatory cytokines and chemokines, such as *Il-1β*, *Il-6* and *Cxcl2*. FRB supplementation also increased the level of anti-inflammatory cytokine Il-10, tight junction component *Clad4*, and anti-microbial proteins *Reg3γ* and *Lcn2*. Furthermore, it also suppressed the expression of *Col1a1* and *Col1a2*, markers of intestinal fibrosis.

Conclusion: FRB supplementation was able to aid intestinal restoration and may reduce fibrosis development due to DSS-induced inflammation.

fermented rice bran, inflammation, dextran sodium sulfate

発表責任者：Afifah Zahra Agista（agista@g-mail.tohoku-university.jp）

講演番号：3C05-11
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 11:00～ ミーティングルーム C

The effects of butyrate on immune checkpoint signaling and improvement of psoriasis

○Hinako IKEDA, Shodai SUZUKI, Takuya YASHIRO, Chiharu NISHIYAMA (Tokyo Univ. Sci.)

Short Chain Fatty Acids (SCFAs) are produced by the commensal gut microbiota during the fermentation of dietary fiber as secondary metabolites. Several recent studies have indicated that SCFAs contribute to the maintenance of homeostasis and the suppression of inflammation by modulating the function of immune cells. SCFAs improve the immune-related diseases, such as inflammatory bowel disease, and rheumatoid arthritis by accelerating Treg development, increasing IL-10 production in lymphoid cells, suppressing the activation of neutrophils and eosinophils. In addition, we recently found that SCFAs suppress mast cell-mediated allergic response *in vitro* and *in vivo*. However, the involvement of immune checkpoint molecules, which play a key role in the suppression of T cell-mediated immune responses, in the effects of SCFAs are largely unknown. In the present study, we evaluated the effects of SCFAs on the expression and function of immune checkpoint molecules.

We prepared splenocytes from OT-II mice, which are transgenic for ovalbumin (OVA) responsive TCR, and treated whole cells with OVA peptides in the presence of 4 types of SCFAs (acetate, propionate, butyrate, valerate). By flow-cytometric analysis targeting checkpoint molecules, we found that butyrate treatment elevated the expression of PD-L1, PD-L2, CD155 on dendritic cells (DCs), and the expression of TIGIT on $CD4^+$T cells. Next, we investigated whether SCFA-induced upregulation of checkpoint molecules affects the DC-dependent activation of T cells. When naïve OT-II $CD4^+$T cells were co-cultured with OVA-pulsed DCs, marked amount of IL-2 was detected in culture supernatant. The addition of butyrate into the co-culture media significantly suppressed the IL-2 levels, which was partially recovered in the presence of anti-PD-L antibodies and anti-CD155 antibodies. These results suggest that butyrate promotes the interaction of immune checkpoint molecules between DCs and T cells, resulting in the suppression of T cell activation. It is reported that immune checkpoint signals contribute to the suppression of psoriasis, so next we validated the effect of butyrate against psoriasis. Topical application of imiquimod cream induced the psoriasis symptom on the mice's ear, and oral administration of butyrate suppressed the hyperplasia significantly. Taken together, we demonstrate that butyrate enhances the immune checkpoint signals by acting on DCs and T cells, and that butyrate administration improves the symptom of psoriasis in mice. We are going to perform further analysis to reveal biological significance of SCFA-induced expression of checkpoint molecules and the molecular mechanism by which butyrate alleviates psoriasis.

butyrate, immune checkpoint molecules, psoriasis

講演番号：3C05-12
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 11:00～ ミーティングルーム C

Intestinal Regulatory T Cell Induction by ß-Elemene Alleviates the Formation of Fat Tissue-Related Inflammation

○Yingyu ZHOU[1,2], Tomohiro TAKANO[1,2], Yimei WANG[1,2], Xuyang LI[2], Rong WANG[1,2], Yoshio WAKATSUKI[3], Haruyo ADACHI(NAKAJIMA)[1,2], Masaru TANOKURA[1,2], Takuya MIYAKAWA[2], Satoshi HACHIMURA[1,2] ([1]Res. Cent. Food Safety, Univ. Tokyo, [2]Dept. Appl. Biol. Chem.,Univ. Tokyo, [3]Dept. Clin. Bio-regulatory Sci., Kyoto Univ. Grad. Sch. Med.)

【Background】The role of the intestinal immune system in the inhibition of fat tissue-related inflammation by dietary materials is yet to be elucidated. In this study, a mouse model was used to examine the anti-inflammatory effects of food substances-derived β-elemene on high fat diet (HFD)-induced obesity, a kind of chronic inflammation.

【Methods】Male C57BL/6N mice were assigned to a control group, HFD group or HFD with β-elemene suspension treatment group. Immune cell subsets' status and inflammatory cytokines' expression were clarified in cells and tissues of each treatment group mainly by qPCR and flow cytometry. For *in vitro* experiments, β-elemene was added directly to cell cultures. Co-culture experiments of intestinal dendritic cells (DCs) and $CD4^+$ T cells were performed with cells from BALB/c mice and T cell receptor transgenic mice, respectively. RALDH2 activity of intestinal DCs was evaluated by ALDFLUOR reagent using flow cytometry.

【Results】Oral administration of β-elemene was observed to downregulate the expression of inflammatory cytokines, decrease classically activated M1 macrophages and increase the proportion of $Foxp3^+CD4^+$ regulatory T cells (Tregs) among stromal vascular cells of adipose tissue in obese mice. However, β-elemene did not affect the inflammatory response of adipose tissue *in vitro*, suggesting that the inhibition observed *in vivo* was not due to direct interactions of adipose tissue with β-elemene. Instead, β-elemene increased Tregs population by enhancing gene expressions of TGF-β1, RALDH2, integrin αvβ8, and IL-10 in intestinal DCs. These effects were observed upon not only β-elemene administration *in vivo* but also in *in vitro* culture. In the *in vitro* system, β-elemene enhanced the induction of $Foxp3^+CD4^+$ T cells both in the presence and absence of TGF-β using intestinal DC and T cells, suggesting that the increased RALDH2 promoted the production of retinoic acid (RA), which cooperatively induced $Foxp3^+$ Tregs with TGF-β. In addition, β-elemene enhanced RALDH2 activity in intestinal DCs. Upregulated RA level and decreased inflammatory responses in the intestine were also suggested by the increased proportion of RA dependent $\alpha4\beta7^+CCR9^+$ T cells under β-elemene treatment. Taken together, the results of this study demonstrated the therapeutic effects of β-elemene on treating experimental obesity-induced chronic inflammation by adjusting the balance of immune cell populations in fat tissue through the generation of Tregs in the intestinal immune system by modulating DC function.

β-Elemene, Obesity, Anti-inflammation

発表責任者：八村敏志（ahachi@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3C05-13
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 11:00～ ミーティングルーム C

Development of a Low-Cost GLP-1 ELISA and Screening for Plant Bio-Active Compound that Promotes GLP-1 Secretion in STC-1 cells.

○Kevin Odongo, Yoko Yamashita, Hitoshi Ashida (Kobe Univ.)

【**Purpose**】Various secretagogues stimulates GLP-1 release from the intestinal enteroendocrine L-cells, but little is known about the role of plant bio-active compounds. This is partly due to expensive commercial assays especially when screening large number of samples. Thus, we developed economical GLP-1 ELISAs for screening of plant bio-active compounds in STC-1 cells.

【**Method**】The 'active' ELISA employed two monoclonal antibodies recognizing the C- and N-terminal epitopes, and a biotinylated secondary antibody. 'Total' ELISA used a capture and biotinylated detection antibodies recognizing the C- and mid-molecular epitopes respectively. Analytical assay guidelines were used for ELISA validation.

【**Results・Conclusion**】The ELISAs measured physiological levels of 'active' and 'total' GLP-1 with dynamic ranges of 4.68 pM ~ 4.68 nM and 0.94 pM ~ 250 pM, respectively. Equal performance was observed with the commercial kits. Cinnamtannin A2 promoted GLP-1 secretion at 10 nM, consistent with our previous *in vivo* results. Thus, we succeeded in developing low-cost GLP-1 ELISAs with the same performance as the commercial products.

glucagon-like peptide 1, flavan-3-ols, diabetes

発表責任者：Kevin Odongo（odongo.k93@gmail.com）

講演番号：3C05-14
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 11:00～ ミーティングルーム C

Ethanolamine plasmalogen attenuates DSS-induced colitis in vivo and ameliorates inflammatory stressed human intestinal tract cells in vitro by suppressing apoptosis

○EPHANTUS BERNARD[1], Shinji Yamashita[1], Kei Kumagai[2], Yurika Otoki[2], Ayaka Yamamoto[3], Takahiro Eitsuka[2], Kiyotaka Nakagawa[2], Teruo Miyazawa[2], Mikio Kinoshita[1] ([1]Obihiro Univ., [2]Tohoku Univ, [3]Yaizu Suisankagaku Ind.)

Ethanolamine plasmalogen (PlsEtn) is a sub-class of ethanolamine glycerophospholipids (EtnGpl) with unique characteristic of a vinyl-ether linkage in sn-1 position and is dysregulated during colon cancer development. However, the protective role of dietary PlsEtn during colon inflammatory-related disorders (inflammatory bowel disease (IBD) and colon cancer) and the underlying mechanisms are not clearly established. Therefore, in our studies, we investigated the functional role of dietary EtnGpl with high PlsEtn from ascidian muscle (87.3 mol% PlsEtn in EtnGpl) and with low PlsEtn from porcine liver (7.2 mol% PlsEtn in EtnGpl) in dextran sodium sulfate (DSS)-induced colitis *in vivo* and lipopolysaccharide (LPS)-treated differentiated Caco-2 cells as an intestinal tract *in vitro* model.

In DSS-induced colitis mice experiment, two groups of mice received AIN-93G diet containing 1% fish oil (blank and control group) and another two groups received AIN-93G diet containing 1% fish oil and 0.1% porcine liver or ascidian muscle EtnGpl (porcine liver and ascidian muscle groups, respectively). Colitis was induced *in vivo* by administering 1.5% DSS in drinking water to the control, porcine liver and ascidian muscle groups. After 16 days (early/middle stage of inflammation) of feeding and DSS administration, elevation of myeloperoxidase (MPO) activity, thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS), pro-inflammatory cytokines and proapoptosis-related proteins levels were observed in colon mucosa of the control group. These phenomenon were suppressed by dietary EtnGpl with ascidian muscle group showing higher suppression compared to the control. After 38 days, body weight loss, intestinal atrophy, and spleen hypertrophy were observed in the control group. On the other hand, dietary EtnGpl suppressed the observed symptoms, with ascidian muscle group showing superior effects than the control. In the *in vitro* experiment, LPS (50 μg/mL) induced apoptosis of differentiated Caco-2 cells by 41.3%, which was suppressed by EtnGpl in a dose-dependent manner (1 ~ 50 μM). Cells treated with 50 μM ascidian muscle EtnGpl containing high PlsEtn level showed a lower degree of apoptosis, and downregulated TNF-α and apoptosis-related proteins compared to 50 μM porcine liver EtnGpl treatment containing low PlsEtn level.

Taken together, the findings in our studies indicate; 1. PlsEtn exerted the observed effects, which provided protection against induced inflammatory stress and 2. The abundance of vinyl ether linkages in PlsEtn has superior effects. Therefore, PlsEtn can potentially be used as a strategic dietary therapy for colon inflammation-related disorders such as IBD and colon cancer.

apoptosis, ethanolamine plasmalogen, inflammatory bowel disease

発表責任者：Shinji Yamashita（syamashita@obihiro.ac.jp）

講演番号：3C05-15
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 11:00～ ミーティングルーム C

Geranylgeraniol attenuates lipopolysaccharide-induced inflammation in MG6 mouse microglial-derived cells

○WAHYU DWI SAPUTRA, YUSUKE OHSAKI, MICHIO KOMAI, HITOSHI SHIRAKAWA (Lab. Nutr., Grad. Sch. Agri. Sci., Tohoku Univ.)

Geranylgeraniol (GGOH) is a plant-derived isoprenoid known to have an anti-inflammatory effect in lipopolysaccharide (LPS)-administered macrophage-like cells and animal models. It shared a similar chemical structure with the side chain of menaquinone-4 (MK-4), a vitamin K_2 subtype. Previously, we reported that MK-4 managed inflammation in LPS-induced MG6 mouse microglial-derived cells[1)]. The persistent inflammatory reaction in microglial cells has been linked to the progression of neurodegenerative diseases through the over-production of proinflammatory cytokines. In this study, we investigated whether GGOH administration also exerts anti-inflammatory effect in activated mouse-microglial derived cells. MG6 cells with or without pretreatment of GGOH were exposed to LPS. The pro-inflammatory cytokines mRNA levels were analyzed using qRT-PCR, while protein expressions especially which were related to NF-κB signalling cascade were detected by western blotting. We found that GGOH dose-dependently suppressed LPS-induced mRNA levels of *Il-1β*, *Tnf-α*, *Il-6, Cox-2* and *IκBα*. GGOH inhibited the up-regulation of IRAK1 and TRAF6 as well as the phosphorylation of Tak1, IKKα/β and NF-κB p65 proteins. Furthermore, it inhibited the p65 nuclear translocation under LPS influence while up-regulated the IκBα expressions. On the other hand, other isoprenoids administration especially farnesol and phytol also exhibited the down-regulation toward the LPS-induced pro-inflammatory cytokines expressions in MG6 cells. These results suggest that GGOH has a preventive effect against the microglial inflammation induced by LPS via the modulation of NF-κB signalling pathway.

1) Saputra et al., Int J Mol Sci (2019) 20, 2317, doi: 10.3390/ijms20092317.

Geranylgeraniol, Microglia, Inflammation

講演番号：3C05-16
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 11:00～ ミーティングルーム C

Sugar, organic acid, and MS-e-nose properties of non-centrifugal cane sugars from Japan and ASEAN countries

○Yonathan ASIKIN[1], Koji WADA[1], Eito TSUCHIDA[2], Goki MAEDA[2], Vu Tuan NAM[3], Fitriyono AYUSTANINGWARNO[4], Siti HAJAR-AZHARI[5] ([1]Faculty of Agriculture, University of the Ryukyus, [2]Regional Agricultural System Section, Okinawa Prefectural Agricultural Research Center, [3]Institute of Genome Research, Vietnam Academy of Science and Technology, [4]Faculty of Medicine, Diponegoro University, [5]Faculty of Food Science and Technology, University Putra Malaysia)

Non-centrifugal cane sugar (NCS), commonly known as brown sugar (or *kokuto* in Japanese), is a dehydrated-solidified form of sugar syrup of sugarcane, and widely used as table sugar as well as raw material for production of various foods and beverages. To assess food quality and flavor profile differences of domestic- and overseas-origin brown sugars, twenty six NCS products from domestic (Okinawa, Kagoshima, Aichi, and Kochi) and ASEAN countries (Vietnam, Indonesia, and Malaysia) were evaluated in term of their sugar, organic acid, and volatile flavor properties. Sugars and organic acids of the NCS were measured by HPLC analyses. The composition of volatile flavor was evaluated by GC-flame ionization detection/mass spectrometry (GC-FID/MS) and MS-based electronic-nose (e-nose) profiling detection. Each NCS had distinct composition of sugars and organic acids which might affect sweetness and sourness properties of the product, respectively. Malaysian NCS products had higher range of sugars content (92.48–92.98 g/100 g) than that of domestic produces. However, sugar composition of NCS which comprised of sucrose, fructose, and glucose greatly differed from one to another. There was also great variation in the organic acid contents of NCS products, wherein products from Aichi contained significant amounts of aconitic acid (0.79–2.40 g/100 g), while three Okinawan and one Indonesian products remarkably comprised higher acetic acid (0.20–0.22 g/100 g). Moreover, MS-e-nose analysis provided inclusive volatile flavor profile of these NCS products by providing alteration in the intensities of ion masses from their volatile components as a numerical dataset. The multivariate statistical evaluation showed association and differentiation of volatile flavor profile among NCS products through principal component analysis (PCA) plots. The PCA results also displayed some key characteristic ions for associated aroma compounds in NCS, including acetaldehyde (m/z 42 and 43) from NCS products of Okinawa origin, pyrazines (m/z 94 and 108) from Aichi origin, and acetic acid (m/z 45 and 60) from Indonesia and Vietnam origins. Additionally, MS-e-nose profiling presented a hierarchical clustering plot and differentiated NCS products from Japan and ASEAN countries into eight statistical clusters, wherein most of NCS products of ASEAN origins had comparable volatile profiles with some of domestic produces, except for two NCS products from Aichi and one from Vietnam which were solely separated from others.

non-centrifugal cane brown sugar, food components, MS-e-nose aroma profile

発表責任者：Yonathan ASIKIN（y-asikin@agr.u-ryukyu.ac.jp）

講演番号：3C06-01
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:00～ ミーティングルーム C

並行複式無機化法による病原性フザリウムに対しての病害抑止土壌の生成

Generation of disease suppressive soil to the phytopathogen Fusarium oxysporum with non-soil carrier by using a multiple parallel mineralization technique

ミーブン ジャムジャン[1]、藤原 和樹[1]、宮本 憲二[2]、加藤 康夫[3]、安藤 晃規[4,5]、小川 順[4,5]、○篠原 信[1]([1]農研機構、[2]慶大理工、[3]富山県大・生医工研セ、[4]京大院農、[5]京大・生理化学研究ユニット)
Jamjan Meeboon[1], Kazuki Fujiwara[1], Kenji Miyamoto[2], Yasuo Kato[3], Akinori Ando[4,5], Jun Ogawa[4,5], ○Makoto Shinohara[1] ([1]NARO, [2]Dept. Biosci. Inform., Keio Univ., [3]Biotech. Res. Cent., Toyama Pref. Univ., [4]Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [5]Res. Unit Physiol. Chem. Kyoto Univ.)

連作しても根部病害の発生がしづらい、病害抑止土壌と呼ばれる農耕地が世界各地で発見されているが、そのメカニズムはいまだ不明で、病害抑止土壌を創出する技術も存在していない。それ以前に、土壌の基本的な機能である、有機物を分解し無機養分を生成する機能（無機養分生成能）を非土壌媒体で再現する技術はこれまで存在しなかった。我々は、非土壌媒体の一つである水で無機養分生成能を再現し、有機物を加えて栽培できる有機質肥料活用型養液栽培を開発した。この技術を応用し、ロックウールなど他の非土壌媒体に微生物群を固定化し、無機養分生成能を再現し、土壌の創出が可能となった。有機質肥料活用型養液栽培では、病原性フザリウムの抑止効果がある。そこで本研究では、ロックウール、バーミキュライト、燻炭などの非土壌媒体でも、病原性フザリウムに対する抑止効果を示すか、検討を行った。また、有機質肥料の種類の影響を検討した。以上の結果、媒体の種類、有機質肥料の種類にかかわらず、病害抑止効果を示すことが明らかとなった。これは、病害抑止土壌の人工的創出技術の可能性を示唆するものである。

Disease suppressive soils, are difficult to cause root disease even after continuous cropping, have been found all over the world. However, the mechanism is still unclear, and there is no technology to create disease suppressive soil. Prior to that, there was no technology to reproduce the function of decomposing organic matter to produce inorganic nutrients in a non-soil medium. We have developed an organic hydroponic technique that reproduces the ability to generate inorganic nutrients from organic matter in water. By applying this technology, even in other non-soil media such as rock wool, the ability to generate inorganic nutrients is imparted by immobilizing the microbial community. It has become possible to create soil. The effect of suppressing pathogenic Fusarium has already been recognized in organic hydroponics. In this study, we investigated whether non-soil media such as rock wool, vermiculite, and smoked charcoal, immobilized with microbiota could show a suppressive effect on pathogenic *Fusarium*. We also examined whether various organic fertilizer had a suppressive effect. These results show a disease-suppressing effect regardless of the type of medium and the type of organic fertilizer added. This suggests the possibility of artificial creation technology for disease suppressive soil.

disease suppressive soil, Fusarium oxysporum, multiple parallel mineralization

発表責任者：篠原信（shsh@affrc.go.jp）

講演番号：3C06-02
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:00～ ミーティングルーム C

ヤマブシタケ抽出物に含まれる歯周病原性細菌 *Eikenella corrodens* のバイオフィルム阻害タンパク質の精製と解析

Purification and characterization of biofilm inhibitor against periodontopathogenic bacterium *Eikenella corrodens* from Yamabushitake extract

○阿座上 弘行、濱治 百々子、TANIGUCHI Shogo、IIDA Ryohei (山口大農)
○Hiroyuki AZAKAMI, Momoko HAMAJI, 彰吾 谷口, 亮平 飯田 (Yamaguchi Univ.)

ヤマブシタケ（*Hericium erinaceum*）は抗認知症、抗炎症性、抗酸化性など様々な薬理作用が報告されている食用きのこである。本研究では、ヤマブシタケ水抽出物が歯周病原性細菌 *Eikenella corrodens* のバイオフィルム形成を阻害することを発見した。さらに、その阻害効果は、用量依存的に観察され、*E. corrodens* に対する抗菌性によるものではなかった。ヤマブシタケ抽出物を硫安分画したところ、70%沈殿画分にバイオフィルム阻害が見られた。熱処理によってその阻害効果は減少したが、100℃の処理でも阻害効果は完全には失われなかったことから、阻害物質は熱に安定なタンパク質成分であることが示唆された。限外ろ過やイオン交換クロマトによる分画により、阻害物質は 60−100 kDa のタンパク質であることが示唆された。さらに、ヤマブシタケ抽出物は一度形成したバイオフィルムを壊す能力も示した。

Hericium erinaceum (Yamabushitake) is an edible mushroom that has been reported to display various pharmacological activities, including neuroprotective, anti-inflammatory, and antioxidant effects. In this study, we found that the water extract of *H. erinaceum* inhibited biofilm formation of the periodontopathogenic bacterium *Eikenella corrodens*. Moreover, the biofilm inhibitory effect of *H. erinaceum* was observed in a dose-dependent manner and was not due to bactericidal activity against *E. corrodens*. *H. erinaceum* extract was fractionated by ammonium sulfate precipitation and biofilm inhibition was achieved with the 70% fraction. Heat treatment of the 70% fraction did not completely prevent biofilm inhibition, suggesting that partially heat-stable proteins are involved in the biofilm inhibition. Further fractionation of the 70% fraction by ultrafiltration indicated that the biofilm inhibitor may be a protein with a molecular weight of approximately 60 to 100 kDa. Moreover, we purified biofilm inhibitor using ion exchange chromatography. It is also suggested that *H. erinaceum* extract could degrade the biofilm once formed.

biofilm, yamabushitake, periodontopathogenic bacteria

発表責任者：阿座上　弘行（azakami@yamaguchi-u.ac.jp）

講演番号：3C06-03
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:00～ ミーティングルーム C

ニホンミツバチ由来乳酸菌の単離と諸性質の解析

Isolation, identification, and characterization of lactic acid bacteria in Japanese honey bee and its products

○櫻間 晴子[1]、吉崎 泰貴[1]、坂本 文夫[1,2]、萩下 大郎[1] ([1]京都先端大バイオ環境、[2]京都ニホンミツバチ研究所)
○Haruko Sakurama[1], Taiki Yoshizaki[1], Fumio Sakamoto[1,2], Tairo Hagishita[1] ([1]Kyoto Univ. of Adv. Sci., [2]Kyoto apis cerana japonica Lab.)

【目的】乳酸菌はその保健効果から広くプロバイオティクスとして利用されている．しかし，これらの乳酸菌はヒトや発酵食品などから単離されたものがほとんどである。これまでに，我々は，在来種であるニホンミツバチ（*Apis cerana japonica*）の腸内細菌の最優占種が *Lactobacillus* 属（30.5%）であることを示した．しかし，昆虫に由来する乳酸菌に関する知見はいまだ不十分である．そこで，本研究では，ニホンミツバチとその産物（蜂蜜や蜜蝋）から単離された乳酸菌の特徴を明らかにすることを目的とした．
【方法】乳酸菌の単離は嫌気条件下で炭酸カルシウム含有 MRS 培地を用いた．単離された菌株について，NucleoSpin Tissue（MN 社）によってゲノムを調製し，16S rDNA 配列解析により菌種を推定した．単離菌の特徴はアピ 50CH やアピザイム（ビオメリュー社製）を使用して基質の資化性や酵素の活性を調べた。
【結果と考察】ニホンミツバチの腸からは *Lactobacillus apis* と *L. panisapium* の近縁種，ニホンミツバチの産物からは *L. kunkeei* や *L. paracasei* の近縁種を単離した．これら菌株は，イヌリンや D-タガトース，糖アルコール（D-ソルビトールなど）を資化した．また，蜂蜜に含まれる D-メレジトースを資化することがわかった．今回単離されたニホンミツバチ由来の乳酸菌は特徴的な基質の資化性が見られ，昆虫の体内という特殊な環境に適応した可能性が示唆された．
【Introduction】There is currently great interest in probiotic lactic acid bacteria with new potential. However, most lactic acid bacteria are isolated from humans and fermented foods. We have already shown that the genus *Lactobacillus* (30.5%) is the predominant species of bacteria in the intestines of Japanese honeybee. (*Apis cerana japonica*). However, the knowledge about lactic acid bacteria derived from insects is poorly understood. The purpose of this study was to define the characteristics of lactic acid bacteria isolated from Japanese bees and their products (honey and beeswax).
【Results and Discussion】*Lactobacillus apis* and *L. panisapium* relatives were isolated from intestines of Japanese honeybees, and *L. kunkeei* and *L. paracasei* relatives were isolated from their products. These strains can utilize inulin, D-tagatose, and sugar alcohol (D-sorbitol etc.). It was also found that D-melezitose contained in honey was assimilated. Lactic acid bacteria isolated from the bees showed characteristic substrate assimilation, suggesting that it may have adapted to the internal environment of insects.

lactic acid bacteria, Japanese honey bee

発表責任者：櫻間晴子（sakurama.haruko@kuas.ac.jp）

講演番号：3C06-04
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:00～ ミーティングルーム C

蛍光タンパク質を発現させた *Methylobacterium* 属細菌のアカシソ上での動態解析

Dynamics of two *Methylobacterium* strains expressing fluorescent protein on red perilla

○片山 志織[1]、由里本 博也[1]、谷 明生[2]、阪井 康能[1]（[1]京大院農、[2]岡山大植物研）
○ Shiori KATAYAMA[1], Hiroya YURIMOTO[1], Akio TANI[2], Yasuyoshi SAKAI[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Okayama Univ.)

Pink-pigmented facultative methylotroph (PPFM) として知られる *Methylobacterium* 属細菌は、植物の細胞壁成分ペクチンメチルエステルの加水分解産物であるメタノールを利用して植物上に棲息している。植物に対し生長促進効果をもたらす菌株も知られているが、共生のメカニズムについては不明な点も多い。我々は以前、アカシソ（*Perilla frutescens crispa* (Thunb.) Makino）の葉と種子に *Methylobacterium* sp. OR01 株が優占的に存在することを発見した[1)]。OR01 株を種子に接種したアカシソでは、生長した葉の先端や周辺部に特に多くの OR01 株が定着しており、気孔内にも多数入り込んでいる様子が観察された[2)]。

本報告では、蛍光タンパク質を発現させた OR01 株と *Methylobacterium aquaticum* 22A 株のアカシソ上での動態を解析した。22A 株はエゾスナゴケ（*Racomitrium japonicum*）から単離され、植物成長促進作用を持つ[3)]。OR01 株と 22A 株を単独または混合で種子に接種し、葉上の細胞数をフローサイトメトリーを用いて経時的に測定し、その推移を明らかにした。単独で接種した場合、OR01 株、22A 株ともアカシソ葉上に長期間定着していたが、２種を競合させると 22A 株はほとんど生存できず、常に OR01 株が優占していた。葉を培地に押し当て出現したコロニーのパターンを解析すると、OR01 株は葉全体に行き渡って分布していたが、22A 株はコロニーが点在していた。この２種の栄養源に対する走化性を調べたところ、OR01 株のメタノールに対する走化性が 22A 株よりも強いことがわかった。

Methylobacterium sp., also known as pink-pigmented facultative methylotrophs (PPFMs), inhabit on the phyllosphere and utilize methanol hydrolyzed from a cell-wall component pectin. Previously, we have reported that *Methylobacterium* sp. strain OR01 habitats dominantly on the leaves and stems of red perilla (*Perilla frutescens crispa* (Thunb.) Makino). In this study, we analyzed dynamics of strain OR01 compared with *Methylobacterium aquaticum* strain 22A by flow cytometry and microscope observation. The results showed that distribution pattern was different between the two strains. We found that the chemotactic activity of strain OR01 towards methanol is higher than that of strain 22A.

1) Mizuno et al., Biosci. Biotechnol. Biochem., 77, 1533-1538 (2013)
2) 片山ら、日本農芸化学会 2016 年度大会講演要旨　2F035
3) Tani et al., PLos One, 7(3): e33800 (2012)

Methylobacterium, plant-microbe interaction, flow cytometry

講演番号：3C06-05
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:00～ ミーティングルーム C

なぜ培養困難なのか？難培養性微生物 *Nitrospira* の未知増殖制御機構に迫る
Why does *Nitrospira* resist cultivation? -unveiling growth controlling mechanism-
○定廣 晋吾[1]、田村 淳[1]、村上 千穂[2]、加藤 節[1]、中島田 豊[1]、金田一 智規[1]、大橋 晶良[1]、青井 議輝[1] ([1]広島大、[2]安田女大)
○Shingo Sadahiro[1], Atsushi Tamura[1], Chiho Murakami[2], Setsu Katou[1], Yutaka Nakashimada[1], Tomonori Kindaichi[1], Akiyoshi Oohashi[1], Yoshiteru Aoi[1] ([1]Hiroshima Univ., [2]Yasuda Univ.)

ほとんどの微生物は培養困難であることが知られているが、その普遍的な理由を解明できれば、環境微生物の理解や利用を大きく進展させる可能性を秘めている。そこで本研究では、門レベルで難培養性を示す亜硝酸酸化細菌 *Nitrospira* を難培養性微生物のモデルとして用いて、未知増殖制御メカニズムを解明することを目的とする。これまでの我々の検討により、*Nitrospira* は飢餓状態など好ましくない条件において、増殖不能状態に陥り、適切な培養条件でも増殖を再開しないこと（休眠する）が判明している。本研究では、まず亜硝酸酸化活性を指標としたハイスループットアッセイと増殖をシングルセルレベルで追跡することで、休眠から覚醒するために必要な因子を明らかにすることを目指した。その結果、*Nitrospira* 自身が休眠状態から覚醒するためのシグナル様物質を産生することを明らかにした。さらに培養中に休眠・覚醒応答を示さない株が出現することも示唆された。一方で、*Nitrospira* は平板培地上ではコロニーを形成しない（液体培地でしか増殖できない）が、本研究では、新規培養システムを確立することで固体培地中にコロニーを形成させることに成功した。このことから、*Nitrospira* は、自己増殖阻害因子またはゲル化剤に含まれる増殖阻害物質の影響により、コロニーを形成するほど増殖できないことが示唆された。

To clarify reasons why majority of microorganisms resist cultivation is effective for better understanding of microbial functions and further applications. In this study, we aim to elucidate the unknown microbial growth control mechanism using *Nitrospira* as a model for uncultivable microorganisms. *Nitrospira* goes non-growing state (dormant) under unfavorable conditions. By combined use of the high-throughput assay and growth monitoring at the single cell level, we revealed that *Nitrospira* produce signaling-like molecules to resuscitate themselves from dormancy. It was also suggested that the strain which does not go dormant emerged during cultivation (likely to be mutant). On the other hand, *Nitrospira* does not form colonies on solid media (They only can grow in the liquid medium). In this study, we succeeded to make *Nitrospira* form colonies by application of a new cultivation system. This result indicated that *Nitrospira* cannot form colonies on solid media derived from the growth inhibiting factors, produced by themselves, and containing gelling reagent.

unculturable microorganisms, dormant, colony formation

発表責任者：青井　議輝（yoshiteruaoi@hiroshima-u.ac.jp）

講演番号：3C06-06
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:00～ ミーティングルーム C

麹菌固体培養による日本ワインパミス成分の高機能化

High functionalization of Japanese wine pomace constituents by *Aspergillus* solid-state fermentation

○奥川 日菜乃[1]、橋本 敦子[1]、三宅 剛史[2]、伊藤 一成[2]、谷野 有佳[2]、山下 秀行[3]、中川 拓郎[3]、平野 幸司[4]、仁戸田 照彦[1]、神崎 浩[1] ([1]岡山大院・環境生命、[2]岡山県工技セ、[3]樋口松之助商店、[4]果実工房)

○ Hinano OKUKAWA[1], Atsuko HASHIMOTO[1], Tsuyoshi MIYAKE[2], Kazunari ITO[2], Yuka TANINO[2], Hideyuki YAMASHITA[3], Takuro NAKAGAWA[3], Koji HIRANO[4], Teruhiko NITODA[1], Hiroshi KANZAKI[1] ([1]Grad. Sch. Environ. Life Sci., Okayama Univ., [2]Industrial Technology Center of Okayama Prefecture, [3]Higuchi Matsunosuke Shoten, [4]Kajitsu Kobo)

【目的】微生物による構造変換は，二次代謝産物の高機能化の手法としてよく知られている。麹菌は，伝統的発酵食品の製造に用いられ，固体培養において特異的に発現する遺伝子を持つことが知られている。しかし，これまでは，穀物のデンプンやタンパク質の分解による発酵やそれら分解酵素の効率的生産に焦点が当てられてきており，植物二次代謝産物の変換に焦点を当てた例は少ない。そこで本研究では，麹菌固体培養技術を駆使し，ワイン醸造副産物でありポリフェノール類等を豊富に含むワインパミス (絞り粕) の成分を構造変化させ，より有用な機能性を示す化合物を含む素材の創生を目指した。【方法・結果】麹菌固体培養として，シャーレ培養法と無通風箱培養法を用いたところ，どちらの培養法でもワインパミス上で僅かながら麹菌の生育が認められた。興味深いことに，麹菌が生育したワインパミスのMeOH抽出物の，総ポリフェノール量や抗酸化活性に変化が確認され，UPLC分析で，麹菌の固体培養により増加する化合物が複数確認できたことから，麹菌の固体培養によりワインパミス成分が高機能化された可能性が示唆された。さらに，新たに試作した小型通気式固体培養装置によるワインパミス固体培養でも，麹菌の生育を確認し，その成分変化についても併せて報告する。

Microbe-catalyzed structural conversion is well-known for a high functionalization method of secondary metabolites. *Koji* molds are traditionally used in the production of fermented foods and are known to possess genes that are specifically expressed in solid-state culture. While most of studies have focused on the degradation of starch and proteins and on the efficient production of their degradative enzymes, few studies have focused on the conversion of plant secondary metabolites. In this study, we aimed to create new highly functionalized materials from wine pomace by *koji*-molds conversion with a solid-state fermentation method. We found that *koji* molds can grow on wine pomace slightly with both a Petri dish and a Non-air flow box culture methods. Interestingly, the total polyphenol content and the antioxidant activity of the MeOH extract of wine pomace were altered according to the *koji* molds growth, and UPLC analysis of the extracts showed that several compounds were increased by solid-state fermentation of *koji* molds, suggesting that the *koji* cultivation may enhance the functionality of wine pomace. We also found that *koji* molds can grow on wine pomace using a new “Air flow type rotary solid state fermenter for laboratory use”, which we built as a prototype. We will also report the changes in constituents of wine pomace which *koji* molds grow with the new fermenter.

Aspergillus solid state-fermentation, High functionalization, Wine

発表責任者：神崎浩（hkanzaki@okayama-u.ac.jp）

講演番号：3C06-07
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:00～ ミーティングルーム C

麹菌固体培養によるオリーブ葉成分の高機能化
High functionalization of olive leaf constituents by *Aspergillus* solid state fermentation

○橋本 敦子[1]、奥川 日菜乃[1]、三宅 剛史[2]、伊藤 一成[2]、谷野 有佳[2]、山下 秀行[3]、内田 真美[3]、三木 翔平[3]、吉田 靖弘[4]、徐 恵美[4]、菊地 敬一[4]、仁戸田 照彦[1]、神崎 浩[1] ([1]岡山大院・環境生命、[2]岡山県工技セ、[3]樋口松之助商店、[4]日本オリーブ)
○ Atsuko HASHIMOTO[1], Hinano OKUKAWA[1], Tsuyoshi MIYAKE[2], Kazunari ITO[2], Yuka TANINO[2], Hideyuki YAMASHITA[3], Mami UCHIDA[3], Shouhei MIKI[3], Yasuhiro YOSHIDA[4], Megumi JYO[4], Keiichi KIKUCHI[4], Teruhiko NITODA[1], Hiroshi KANZAKI[1] ([1]Grad. Sch. Environ. Life Sci., Okayama Univ., [2]Industrial Technology Center of Okayama Prefecture, [3]Higuchi Matsunosuke Shoten, [4]Nippon Olive)

【目的】微生物による構造変換は二次代謝産物の高機能化法としてよく知られている。オリーブ葉は oleuropein やフラボン配糖体等のポリフェノール類を豊富に含んでおり，我々は酵母によりオリーブ葉抽出物中の oleuropein aglycon が新規化合物へと還元されることを報告してきた。今回，麹菌固体培養技術による微生物変換研究において，ワインパミス成分の変換が確認されたことから，本研究ではオリーブ葉に含まれる化合物を麹菌により変化させ，より有用な機能性を示す化合物を含む素材の創生を目指した。【方法・結果】オリーブ葉粉砕物及び未粉砕物を用いた麹菌のシャーレ固体培養を行ったところ，僅かながら麹菌の生育が認められた。このオリーブ葉麹 MeOH 抽出物の，HPLC 分析，総ポリフェノール含有量の測定，DPPH 法による抗酸化活性測定を行ったところ，葉の粉砕の有無や麹菌の種類の違いにより，oleuropein やフラボン配糖体の加水分解の進行や総ポリフェノール含有量，抗酸化活性の変化に違いが生じた。これにより，麹菌の固体培養によりオリーブ葉成分が高機能化される可能性が示唆された。さらに，無通風箱培養，新たに試作した小型通気式固体培養装置による固体培養でも，麹菌の生育を確認しており，その成分変化についても併せて報告する。

Microbe-catalyzed structural conversion is well known for enhancing the functionality of secondary metabolites. Olive leaves are rich in polyphenols such as oleuropein and flavone glycosides, and we found that yeasts can convert oleuropein aglycone in olive leaf extract to a novel bioactive compound. In this study, we aim to create new materials exhibiting more useful functionality by *Aspergillus* mold-catalyzed conversion of olive leaf constituents, based on our research findings that the *Aspergillus koji* molds possibly converted wine pomace constituents to high functionalized materials.

We found that *koji* molds can grow on the olive leaves slightly with a Petri dish culture method. The characterization of the MeOH extracts of olive leaves revealed that the degree of flavone glycoside hydrolysis, the total polyphenol content and the antioxidant activity were altered according to the *koji* molds growth, suggesting that the solid cultivation of *koji* molds may enhance the functionality of olive leaves. We also found that *koji* molds can grow on olive leaves using “Non-airflow box” and the newly developed “Air flow type rotary solid state fermenter for laboratory use”. We will also report the changes in constituents of olive leaves which *koji* molds grow with both the box and the new fermenter.

Aspergillus solid state fermentation, High functionalization, Olive

発表責任者：神崎浩（hkanzaki@okayama-u.ac.jp）

講演番号：3C06-08
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:00～ ミーティングルーム C

ブドウ果皮共生菌によるワインの自然発酵促進

Promotion of spontaneous wine fermentation by symbiotic grape-skin fungi

○渡辺 大輔、橋本 渉（京大院農）
○Daisuke WATANABE, Wataru HASHIMOTO (Kyoto Univ.)

【目的】伝統的発酵食品の製造では、原材料、発酵微生物、環境微生物の三者が相互作用を示す。ワインの起源では、ブドウ果皮に生息する酵母が果汁を自発的にアルコール発酵したとされるが、無傷ブドウ果皮は栄養源に乏しく、高い発酵力を有する *Saccharomyces* 属酵母（発酵微生物）の生育に適さない。一方、*Saccharomyces* 属酵母が資化できない細胞表層成分を利用する果皮常在菌（環境微生物）が共生しているが、概して発酵力が低くワインを醸造することはできない。この謎を解明するため、果皮常在菌の代謝特性に着目し、ワインの自然発酵における微生物間相互作用の理解を目指した。
【結果と考察】市販ブドウ *Vitis vinifera* から単離した果皮常在菌の中にはアルコール発酵を行わない菌種が存在していた。ところが、無傷ブドウ、*S. cerevisiae* との三者共培養系では、これらの非発酵性菌が発酵初速度を上昇させる効果を有していた。本効果は培養上清でも認められ、無傷ブドウを基質とした発酵を促進する酵素の分泌が示唆された。果皮常在菌の炭素代謝特性を解析し、酵母様真菌 *Aureobasidium pullulans* や非発酵性の担子菌酵母（*Cryptococcus* 属、*Sporobolomyces* 属、*Rhodotorula* 属）が、果皮表面を覆う細胞壁やクチクラ層を分解し資化することを明らかにした。以上の結果から、ワインの自然発酵では、果皮常在菌による細胞表層成分の分解に伴って、*Saccharomyces* 属酵母のブドウ果肉へのアクセスが容易となり、発酵しやすい環境が醸成される可能性が示された。

【Purpose】Production of traditional fermented foods and beverages involves interactions between raw materials, fermentation microorganisms, and symbiotic microbial ecosystems. In the origin of wine, natural grape-skin yeasts are believed to spontaneously trigger alcoholic fermentation; however, high-fermenting *Saccharomyces* yeast species do not usually grow on nutrient-poor grape skins. Most fungi inhabiting grape skins show no fermentation performance. So, how do they cope with natural wine fermentation?
【Results and Discussion】Here we found that nonfermenting grape-skin fungi increase the initial fermentation rates of *S. cerevisiae* using intact grape berries as substrates. Since culture supernatants showed similar activity, grape-skin fungi may secrete enzymes that promote alcoholic fermentation by *S. cerevisiae*. Yeast-like mold *Aureobasidium pullulans* and basidiomycete yeasts, such as *Cryptococcus*, *Sporobolomyces*, and *Rhodotorula* species, isolated from grape skins, degraded or assimilated plant cell wall and cuticle components. Thus, grape-skin fungi as decomposers may enable *S. cerevisiae* to easily access fermentable sugars in the pulp. This study highlights the critical roles of symbiotic microbial ecosystems in establishment of spontaneous wine fermentation.

spontaneous fermentation, grape-skin fungi, microbial symbiosis

発表責任者：橋本 渉（hashimoto.wataru.8c@kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3C06-09
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:00～ ミーティングルーム C

麹菌糖転移酵素による清酒中オリゴ糖の生成
Involvement of transglycosylation in oligosaccharide generation in sake
○金本 湧太[1]、本田 千尋[1]、竹久 まや[2]、小林 泉美[1]、勝田 亮[3]、松村 聡美[4]、我妻 いずみ[1]、進藤 斉[1]、穂坂 賢[1]、額田 恭郎[3]、徳岡 昌文[1] ([1]東農大院農、[2]東農大院応生、[3]東農大生命、[4]東農大応生)
○ Yuta KANEMOTO[1], Chihiro HONDA[1], Maya TAKEHISA[2], Izumi KOBAYASHI[1], Ryo KATSUTA[3], Satomi MATSUMURA[4], Izumi WAGATSUMA[1], Hitoshi SHINDO[1], Masaru HOSAKA[1], Tomoo NUKADA[3], Masafumi TOKUOKA[1] ([1]Grad. Sch. Agric., Tokyo Univ. Agric., [2]Grad. Sch. Appl. Biosci., Tokyo Univ. Agric., [3]Fac. Life. Sci., Tokyo Univ. Agric., [4]Fac. Appl. Biosci., Tokyo Univ. Agric.)

清酒中の糖は、グルコース及び二糖以上のオリゴ糖により構成されており、二糖と三糖のオリゴ糖については麹菌 *Aspergillus oryzae* のα-グルコシダーゼの糖転移作用によって生成すると考えられている。我々は、重合度(DP)6 の清酒中オリゴ糖が、DP6-1 と DP6-2 の 2 つの構造異性体で構成され[1)]、DP6-2 は、マルトテトラオースの非還元末端にイソマルトースがα-1,6 結合で分岐した構造であることを明らかにした。DP6-2 に存在する連続したα-1, 6 結合は、米澱粉の部分構造からは見いだされていないことから、本研究では DP6-2 が麹菌酵素による糖転移で生成した可能性について検討した。

麹菌の主要なα-グルコシダーゼ遺伝子である *agdA* 及び *agdB* それぞれの破壊株を用いて清酒小仕込みを行い、含まれるオリゴ糖を比較したところ、*agdA* 破壊株の清酒からは DP6-2 が検出されなかった。また、AgdA と AgdB を組換えタンパク質として発現し、精製した酵素による *in vitro* での糖転移試験を行ったところ、AgdA の反応液から LC-TOF/MS において DP6-2 と質量と溶出時間が一致するピークが検出された。以上より、DP6-2 が AgdA による糖転移で生成することが示唆され、清酒中の三糖より重合度がより大きいオリゴ糖の生成にも麹菌酵素による糖転移が寄与している可能性が示された。[1)] Honda, C. *et al* : *Carbohydrate Polymers* **251**, 116993 (2021)

Disaccharides and trisaccharides in sake are thought to be generated via transglycosylation by α-glucosidase of *Aspergillus oryzae*. We previously determined the structures of the oligosaccharides with degree of polymerization (DP) 6 in sake, namely, DP6-1 and DP6-2. Notably, DP6-2 has an α-1,6 bonded isomaltose at the non-reducing end of the main chain, maltotetraose. As the α-1,6 bonded isomaltose unit is not detected in rice starch, we suspected that the branching unit is generated by transglycosylation.

At first, we brewed sake with rice-*koji* of the gene disruption strains, *agdA* and *agdB*, which are major α-glucosidase in *A. oryzae*, and then found that the sake brewed by Δ*agdA* did not contain DP6-2. Next, we prepared recombinant AgdA and AgdB, and assessed their capability of transglycosylation *in vitro*. LC-TOF/MS analysis showed that AgdA generated a compound whose *m/z* value and elution time were corresponding to those of DP6-2. Our data suggested involvement of transglycosylation in generation of a part of oligosaccharides in sake.

oligosaccharide, transglycosylation, *Aspergillus oryzae*

発表責任者：徳岡昌文（m3tokuok@nodai.ac.jp）

講演番号：3C06-10
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:00～ ミーティングルーム C

発酵食品データベースのアクセス動向と使用法について

Variation of the website accession of Database for Fermented Food and its directions

○楠本 憲一、曲山 幸生（農研機構）
○Ken-Ichi Kusumoto, Yukio Magariyama (NARO)

【目的】
発酵食品データベースは、発酵食品の研究開発、生産、流通、教育の関係者が発酵食品の情報を簡便に収集するためのポータルサイトを提供することを目的として開発した。その後、2019 年 3 月にデータベースを公開（https://ffdb-web.dc.affrc.go.jp/）した。本発表では、当データベースの閲覧数について、アクセスログの解析結果からアクセス動向を分析した結果を紹介する。併せて、データベース使用法と使用時の注意点についても解説する。
【方法】
DB サーバを PostgreSQL、Web サーバを Apache+PHP の環境でシステム開発をおこなった。みそ文化誌、納豆沿革史、関係原著論文等をもとに登録作業をおこなった。アクセス動向の解析については、アクセスログを DB サーバからダウンロードして、別途作成したエクセルマクロを用いて実施した。
【結果】
公開直後 2 週間の累積アクセス数は 2685 件であったが、その後 2019 年 10 月の時点で 14,000 件以上、本年 10 月の時点で 38,000 件以上に達した。また、曜日別のアクセス数を解析した結果、平日のアクセス数が休日よりも多いことがわかった。このことは、本データベースが業務の中で使用され、企業などが発酵食品の情報収集を目的として使用していると考えられた。さらに、アクセス数の高い月の詳細情報を調べた結果、各種展示会や学会、研究会で本データベースの紹介や使用法などを説明した日時にアクセス数が増大した。

Database for Fermented Food (https://ffdb-web.dc.affrc.go.jp/) was developed and published.. In this presentation, the result of the analysis for variation of the website accession and its trend will be discussed. The development of the database was performed with PstgreSQL for DB server and with Apache+PHP for Web server. Data in the DB server were collected from the published books obtained from each industrial cooperative organization. Access logs were downloaded from the server and analyzed with Excel Macro file. The number of total page accession reached to over 38,000 at last October. The access pattern analysis revealed that the users access the database site at weekdays more than weekend. The access number increased after the presentation of this database in the academic meetings.

database, fermented food, website accession analysis

発表責任者：楠本　憲一（kusumoto@affrc.go.jp）

講演番号：3C06-11
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:00～ ミーティングルーム C

従属栄養硝化菌 *Alcaligenes faecalis* におけるピルビン酸オキシムジオキシゲナーゼ遺伝子の発現制御

Transcriptional regulation of pyruvic oxime dioxygenase genes in heterotrophic nitrifier, *Alcaligenes faecalis*

○辻野 修平[1]、道羅 英夫[2]、藤原 健智[1] ([1]静大院・創造、[2]静大・グリーン研)
○Shuhei TSUJINO[1], Hideo DOHRA[2], Taketomo FUJIWARA[1] ([1]Grad. Sch. of Sci. and Tech., Shizuoka Univ., [2]RIGST, Shizuoka Univ.)

アンモニアを亜硝酸や硝酸へと変換する硝化作用は窒素サイクルにおける必須のプロセスである。我々は，土壌細菌 *Alcaligenes faecalis* を用いて従属栄養性の硝化に関する研究を行なっている。炭素源として有機酸，窒素源としてアンモニウム塩を含む培地で *A. faecalis* を好気的に培養すると，窒素過剰となる低 C/N 比条件で強い硝化活性が誘導され，培地中に亜硝酸塩と硝酸塩が高濃度に蓄積する。*A. faecalis* によるこの硝化は，独立栄養性微生物によるアンモニア酸化（硝化）とは異なる，オキシム化合物を中間代謝産物とする反応プロセスによるものであり，そこでは pyruvic oxime dioxygenase（POD）と呼ばれる酵素が中心的な役割を果たしている。

今回我々は *A. faecalis* を用いてトランスクリプトーム解析を行い，*pod* 遺伝子の転写が C/N 比に依存して制御されることを確かめた。さらに，*pod* 遺伝子とクラスターを形成している，細胞外基質の取り込みや芳香族化合物の代謝に関与する遺伝子が *pod* 遺伝子と同一の制御系によって転写調節されていることを見出した。独立栄養硝化が ATP 合成と共役した異化反応であることとは対照的に，従属栄養的な硝化はエネルギーの消費を伴うプロセスであると考えられている。今回の結果は，微生物にとっての従属栄養硝化の生理的な意義を理解するための手掛かりとなるかもしれない。

Nitrification, which converts ammonia to nitrite or nitrate, is an essential process in the nitrogen cycle. We have been studying heterotrophic nitrification using the soil bacterium *Alcaligenes faecalis*. When *A. faecalis* is cultivated aerobically in a medium containing organic acid and ammonium as carbon and nitrogen sources, respectively, strong nitrifying activity is induced under condition of low C/N ratio, and nitrite and nitrite accumulate in the medium. Different from ammonia oxidation (nitrification) by autotrophic microorganisms, nitrification performed by *A. faecalis* is a reaction that proceeds via the oxime compound as an intermediate metabolite, and a pyruvic oxime dioxygenase (POD) plays a central role in the reaction.

In this study, we performed a transcriptome analysis using *A. faecalis* and confirmed that a transcription of the *pod* gene is regulated in a C/N ratio-dependent manner. We also found that the genes involved in the uptake of extracellular substrates and the metabolism of aromatic compounds, which form a cluster with the *pod* gene, are controlled by the same regulatory system as that of the *pod* gene. In contrast to the autotrophic nitrification that couples with ATP biosynthesis by oxidative phosphorylation, the heterotrophic nitrification is considered to be an energy-consuming process. The results may provide clues to understanding the physiological significance of heterotrophic nitrification for the microbes themselves.

heterotrophic nitrification, pyruvic oxime dioxygenase, transcriptional regulation

発表責任者：藤原 健智（fujiwara.taketomo@shizuoka.ac.jp）

講演番号：3C06-12
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:00～ ミーティングルーム C

Lrp/AsnC 型転写制御因子によるアミノ酸異化代謝系制御機構の解明

Regulation mechanism on amino acid catabolism by a Lrp/AsnC-type transcriptional regulator

○金井 保、丸山 凌、谷本 充、Liu Rengwei、吉田 晃、山本 康之、跡見 晴幸（京大院工）
○Tamotsu KANAI, Ryo Maruyama, Mitsuru Tanimoto, Rengwei Liu, Ko Yoshida, Yasuyuki Yamamoto, Haruyuki Atomi (Kyoto Univ.)

Lrp/AsnC 型転写制御因子は helix-turn-helix 型の DNA 結合ドメインをもち、主に細胞内のアミノ酸異化代謝・生合成系遺伝子群の転写を調節する。本研究では超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* がもつ Lrp/AsnC 型転写制御因子 TK2110 が関与する生理機能の解明を行った。まずは本遺伝子破壊株のマイクロアレイ解析を行ったところ、宿主株と比べてアミノ酸異化代謝関連酵素遺伝子の転写量が上昇した。中でも L-asparaginase 遺伝子の増加率が大きく、標的遺伝子候補としてさらに解析を進めた。L-Asparaginase 遺伝子プロモーターとの Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) を行った結果、本タンパク質との特異的な結合が確認された。さらに EMSA の結合反応溶液に L-Asn を加えた際に、複合体構造がさらに高分子量化する現象が見られた。この L-Asn 添加により生じる高分子量化が細胞内での転写に与える影響を評価した。天然培地で *T. kodakarensis* を培養し、その際に L-Asn, L-Asp, L-Gln, L-Glu (終濃度 10 mM) をそれぞれ添加した。ウエスタンブロット解析の結果、L-Asn 添加条件でのみ L-asparaginase の発現量が増加したことから、本タンパク質は細胞内で L-asparaginase の転写を制御する転写抑制因子であり、培地内の L-Asn 濃度の上昇により DNA 上で複合体構造が変化し、転写抑制活性が解除されることが示唆された。

The Lrp/AsnC family of transcriptional regulators harbor a helix-turn-helix DNA binding domain and regulate the transcription of genes involved in amino acid metabolism. Here we examine the physiological function of the TK2110 protein, a Lrp/AsnC transcriptional regulator in the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakarensis*. Its disruption resulted in an increase in transcript levels of genes related to amino acid catabolism, including the L-asparaginase gene. Results of Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) indicated that this protein binds to the L-asparaginase gene promoter, and that the mobility decreases upon the addition of L-Asn to the binding mixture. When L-Asn, L-Asp, L-Gln, or L-Glu were individually added to the growth medium of *T. kodakarensis*, L-asparaginase expression was induced only with the addition of L-Asn. The results suggest that this protein represses the transcription of genes related to amino acid catabolism (including L-asparaginase gene) and that the repression is released responding to the presence of L-Asn via changes in structure/assembly of the protein.

Archaea, transcription, asparaginase

発表責任者：金井保（kanai@sbchem.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3C06-13
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:00～ ミーティングルーム C

低温耐性細菌 *Exiguobacterium undae* Su-1 株が産生する細胞外プロテアーゼ EuPrt の遺伝子発現に関する研究～Ca^{2+}による *euPrt* 転写の促進～

Ca^{2+}-induced transcription of *euPrt*, an extracellular metalloprotease gene from psychrotolerant *Exiguobacterium undae* Su-1.

○荒川 清明、原田 順子、渡部 邦彦（京府大・院生環）
○KIYOAKI ARAKAWA, JUNKO HARADA, KUNIHIKO WATANABE (Kyoto Pref. Univ.)

【目的】低温下で高い活性を持ち，高温下で失活する低温活性プロテアーゼは食品加工や洗剤添加等で使われる。当研究室では低温耐性細菌 *Exiguobacterium undae* Su-1 株の新規低温活性プロテアーゼ EuPrt を同定し，これまでに培地中 Ca^{2+}による顕著な酵素活性の誘導および酵素の構造安定化を明らかにした。[1] ここでは、Ca^{2+}が翻訳後の酵素安定化だけでなく *euPrt* 転写の促進にも寄与することを転写レベルでの解析を用いて明らかにした。【方法・結果】栄養豊富な L 培地 (1% peptone，0.5% yeast extract，pH 7.2) および LC 培地 (L 培地 + 25 mM $CaCl_2$) で Su-1 株を 37℃，24 h 培養し，経時的に回収した菌体 (各 OD_{660} = 0.3 相当) の RNA を抽出して，これを qRT-PCR に供した。目的遺伝子 *euPrt* およびリファレンス遺伝子として 16S rRNA 遺伝子の mRNA 転写量を測定した。*euPrt* は両培地で転写され，培養 9 h で最大となったが，この時 LC 培地における相対転写量は L 培地の 3 倍以上を示した。このことから培地中 Ca^{2+}が *euPrt* 転写を促進することが判った。Ca^{2+}の効果を明確に調べるため，Su-1 株の最少培地を検討し，M9 最少培地にビタミン，金属，アミノ酸を加えた mM9 培地を作製した。mM9 培地および Ca^{2+}添加 mM9 培地 (1，3，5 mM $CaCl_2$) で Su-1 株は全て同程度に生育した。注目すべきことに，mM9 培地では酵素活性が見られないのに対し，Ca^{2+}添加 mM9 培地ではいずれも有意な活性が見られた。現在は mM9 培地および 1 mM Ca^{2+}添加 mM9 培地で培養した時の転写解析を進めており，EuPrt 発現に対する Ca^{2+}の転写レベルでの効果がより鮮明になると期待される。

[1] Harada J., Watanabe K. 2012. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 76: 986-992

Cold-active proteases attract the attention of detergent and food processing industries, due to their activity at lower temperatures. EuPrt is a cold-active metalloprotease from psychrotolerant *Exiguobacterium undae* Su-1, whose activity and stability are controlled by Ca^{2+}.[1] In this study, we show that Ca^{2+} is involved in not only stabilization of EuPrt but also to induce the transcription of *euPrt*. *E. undae* Su-1 was grown in nutrient L broth (1% peptone, 0.5% yeast extract, pH 7.2) and LC broth (L broth added 25 mM $CaCl_2$) at 37℃. *euPrt* transcription was quantified by qRT-PCR. *euPrt* transcription peaked at 9 h under either culture. Relative *euPrt* transcription in LC broth was about 3-fold more than that in L broth, and thus Ca^{2+} induced *euPrt* transcription. To know the effect of Ca^{2+} on *euPrt* transcription, we have developed modified M9 minimal medium for *E. undae* Su-1 in the presence/absence of Ca^{2+}, and underway examining *euPrt* transcription in these media.

protease gene, transcription, calcium ion

発表責任者：荒川清明（s820631003@kpu.ac.jp）

講演番号：3C06-14
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:00～ ミーティングルーム C

コリネ型細菌における RNase J の発現制御解析

Regulation of the expression of Ribonuclease J in Corynebacterium glutamicum

○田中 裕也[1]、濱本 渚[2]、澤 誠人[2]、乾 将行[1,2] ([1]RITE、[2]奈良先端大・バイオ)
○Yuya TANAKA[1], Nagisa HAMAMOTO[2], Masato SAWA[2], Masayuki INUI[1,2] ([1]RITE, [2]NAIST)

【目的】我々は有用工業微生物 *Corynebacterium glutamicum* を用いて様々な物質生産に取り組んでいる。有用物質生合成遺伝子の発現制御には、転写開始制御だけでなく転写後制御の理解が重要であるが、*C. glutamicum* における転写後制御の知見は少ない。そこで本研究では主要 RNase のひとつである RNase J の発現制御解析を行った。

【方法と結果】これまでの研究で我々は *C. glutamicum* の RNase J をコードする *rnj* の発現が mRNA の分解段階で自己制御されることを明らかにしている。今回 *rnj* mRNA の 5'末端を決定したところ、野生株では *rnj* 遺伝子上流に 2 箇所の主な転写末端が存在することが判明した。*rnj* 変異株でも同一の個所に末端が検出されたが、それに加えマイナーな 5'末端産物も多く見られた。*rneG* 欠損株では上流側の転写末端は検出されたが下流側の 5'末端は検出できず、この転写末端の生成が RNase E/G に依存することが示された。以上の結果から、*rnj* mRNA は RNase E/G と RNase J による分解制御を受けることが示された。*rnj* 破壊株では低温環境下での生育が阻害されることから発現制御解析を行ったところ、野生株ではコールドショックにより一過的に *rnj* mRNA が増加するが *rnj* 変異株では一過的な増加は観察されなかった。このことからコールドショック発現制御に自己制御が関与していることが示された。

[Purpose] Ribonuclease (RNase) J possesses both 5'–3' exoribonuclease and endoribonuclease activities and plays a major role in ribonucleotide metabolism in various bacteria. However, relatively little is known about its gene regulation. In this study, we investigated the control of *rnj* gene expression in *Corynebacterium glutamicum.*

[Methods and Results] Previously, we showed that RNase J regulates its own gene by degrading mRNA. In this study, we mapped the 5' end of the *rnj* mRNA. Two major 5′end of *rnj* transcript was found in wild type and *rnj* mutant. We also found that *rnj* mutant had more minor 5′end than wild type strain. RNase J may degrade these *rnj* transcripts in wild type cell. One of the 5′end was not detected in *rneG* mutant strain, indicating that generation of this 5′end depends on RNase E/G activity. RNase E/G may firstly cleave the upstream region of *rnj* mRNA, then other enzyme(s) further processes the cleaved product. The expression of *rnj* mRNA was transiently induced by cold shock. However, its transient induction was not observed in the *rnj* mutant strain, suggesting that autoregulation by self-cleavage may be responsible for the induction of *rnj* in cold-shock conditions.

Corynebacterium glutamicum, Ribonuclease, cold shock

発表責任者：田中裕也（tanakayu@rite.or.jp）

講演番号：3C06-15
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:00～ ミーティングルーム C

コリネ型細菌における RNase III の発現制御解析

Regulation of RNase III expression in *Corynebacterium glutamicum*

○澤 誠人[1,2]、田中 裕也[2]、乾 将行[1,2] ([1]奈良先端大・バイオ、[2]RITE)
○Masato SAWA[1,2], Yuya TANAKA[2], Masayuki INUI[1,2] ([1]NAIST, [2]RITE)

【目的】Ribonuclease III（RNase III）は、mRNA、rRNA、non-cording RNA とすべてのタイプの RNA の分解や成熟に関与している。RNase の発現量は自身もしくは他の RNase により mRNA レベルで制御される例が知られている。そこで、本研究では、有用工業微生物 *Corynebacterium glutamicum* における RNase III の発現制御に関し、細菌の主要な RNase である RNase E/G や RNase J による制御について、また RNase III の自己発現制御についても解析を行った。
【方法・結果】RNase E/G や RNase J の破壊株を用いて RNase III をコードする *rnc* mRNA の発現量と mRNA の安定性について解析した。その結果、野生株と比較して *rnc* mRNA の発現量は RNase E/G 破壊株では約 1.8 倍、RNase J 破壊株では約 4.2 倍増加した。また、安定性に関しても RNase E/G 破壊株は約 1.8 倍、RNase J 破壊株では約 1.6 倍増加した。しかしながら、RNase III の機能欠損株を用いて、*rnc* mRNA の発現量を解析した結果、野生株と比較して *rnc* mRNA の発現量と安定性の上昇は見られなかった。以上の結果から、コリネ型細菌では RNase E/G や RNase J により RNase III の発現量が制御されていることが判明、また RNase III の自己発現制御は行われていないことが示唆された。
【Purpose】Ribonuclease III (RNase III) is involved in the degradation and maturation of mRNA, rRNA and non-cording RNA. In this study, we studied the regulation of RNase III expression in *C. glutamicum*. As it is known that some of RNase are regulated at mRNA degradation step, degraded by themselves or by other RNases, the regulation of RNase III by RNase E/G, RNase J, which are the major RNases of bacteria, and autoregulation of RNase III were tested.
【Methods and Results】The expression level and stability of *rnc* mRNA encodes RNase III were analyzed using RNase E/G gene deletion strain (Δ*rneG*) and RNase J gene deletion strain (Δ*rnj*). The *rnc* expression level was increased about 1.8 times in Δ*rneG* strain and about 4.2 times in the Δ*rnj* strain. In addition, the stability increased by about 1.8 times in the Δ*rneG* strain, and increased by about 1.6 times Δ*rnj* strain compared to wild type. Then, *rnc* mRNA expression levels and stability were analyzed using catalytically deficient RNase III mutants. However, the expression level and stability were not changed. These results indicate that RNase E / G and RNase J regulate the expression of RNase III, but RNase III is not autoregulated in *C. glutamicum*.

bacteria, post-transcriptional regulation, ribonuclease

発表責任者：澤　誠人（sawa.masato.sk2@bs.naist.jp）

講演番号：3C06-16
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:00～ ミーティングルーム C

Corynebacterium glutamicum を用いた物質生産を指向した誘導プロモーターの探索
Evaluation of inducible promoters for industrial material production using *Corynebacterium glutamicum*

○小林 雅規[1,2]、久保田 健[2]、乾 将行[1,2] ([1]奈良先端大・バイオ、[2]RITE)
○Masaki KOBAYASHI[1,2], Takeshi KUBOTA[2], Masayuki INUI[1,2] ([1]NAIST, [2]RITE)

【目的】*Corynebacterium glutamicum* は現在多様な物質の生産に利用されている。発現制御因子-誘導プロモーターセット（以下「誘導プロモーターセット」）を用い誘導物質による発現制御を行うと物質生産が効率化できる。例えば、細胞に強い毒性を示す物質を生産する場合、細胞増殖時に生産遺伝子の発現を抑制し一定の細胞数が得られた段階で発現させることで、生成物による細胞毒性の回避と物質生産の効率化が期待される。微生物による物質生産では一般的にグルコースが基質に用いられるが、グルコース存在下で誘導発現に影響が出ることがある。そこで本研究では誘導プロモーターセットとレポーター遺伝子 *Escherichia coli lacZ* を用い、グルコースを基質とした場合の *C. glutamicum* での LacZ 活性を評価し、工業的利用で実用的な利用法を検討した。【方法と結果】誘導プロモーターセットの下流に *E. coli lacZ* を挿入した発現プラスミドを *C. glutamicum* へ導入し、Miller 法で LacZ 活性を測定した。各誘導物質 0.5 mM 添加時の最大 LacZ 活性比は、*E. coli* AraC-P_{araBAD} では L-アラビノース添加で 96.1 倍（2％ グルコース添加時 60.3 倍）、*C. glutamicum* ShiR-P_{shiA} ではシキミ酸添加で 30.7 倍、*C. glutamicum* QsuR-P_{qsuA} ではキナ酸添加で 13.7 倍（同 11.7 倍）、シキミ酸添加で 26.9 倍（同 19.1 倍）だった。以上より現在、AraC-P_{araBAD} を用い L-アラビノース 0.5mM で誘導発現すると基質グルコースからの物質生産の効率化に最も有効と考えられる。今後、他の誘導プロモーターセットおよびペプチドタグを併用した場合についても同様の評価に加え mRNA や LacZ タンパク質レベルでの発現評価を行う。 [Purpose] *Corynebacterium glutamicum* is used to produce a wide variety of substances. When producing highly-toxic-substances efficiently by microbes, it is advantageous to control the gene expression by using a set of expression regulator and inducible promoter (inducible promoter set) to improve the efficiency of production. Glucose is usually used as a substrate for microbial fermentation, but the induction level of inducible promoter is known to be affected in the presence of glucose. In this study, expression plasmids containing an inducible promoter set and the *Escherichia coli lacZ* gene were constructed and introduced into *C. glutamicum*. Then the LacZ activity induced by a specific inducer with or without glucose was measured to determine the best inducible promoter set. [Methods and Results] When introducing the *E. coli* AraC-P_{araBAD} and inducing by 0.5 mM arabinose, LacZ activity ratio was 96.1-fold (without glucose) and 60.3-fold (with glucose), thought to be the highest efficiency to produce from the substrate. In the future, expression levels when the other promoter set is used, and when both the tags and a peptide tag is used will be measured.

β-galactosidase, bacteria, gene regulation

講演番号：3D02-01
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:30～ ミーティングルーム D

米由来グルコシルセラミドの消化管動態および抗炎症メカニズムの検証

Evaluation of rice-derive glucosylceramide dynamics on in vitro gastro intestine and anti-inflammation

○田中 駿、曽我 みちる、山下 慎司、木下 幹朗（帯畜大）
○Shun TANAKA, Michiru SOGA, Shinji YAMASHITA, Mikio KINOSHITA (Obihiro Univ.)

グルコシルセラミド（GlcCer）は、真核生物に普遍的に存在する脂質である。当研究室では特に植物由来の GlcCer の食品機能性について研究を行っており、現在までに大腸腺腫発症抑制 [1]、炎症緩和効果等 [2]を報告している。一方、*in vivo* において食品素材中の GlcCer は消化による生体利用性が低く、抽出物あるいは精製物とすることで生体利用性が向上することが示唆されている [3]。本研究では、米由来 GlcCer に着目し、調理法の違いが食品中の GlcCer 生体利用性に及ぼす影響について人工消化液を用い調査した。また、米由来 GlcCer の詳細な機能性メカニズムを明らかにするために米脂質各画分、長鎖塩基組成の異なる他作物との比較ならびにスフィンゴ脂質代謝酵素阻害剤の影響について腸管モデル細胞系を用いて検討し、炎症刺激に対する長鎖塩基の違いによる影響とその作用機序について考察した。

In vitro 消化法より得られる米消化液中の GlcCer 量を HPLC-ELSD により定量したところ、調理条件により変化が見られた。リポ多糖(LPS)による腸管炎症モデル系は分化型 Caco-2 細胞を用いて、既報に従い行った [4]。結果として、米の脂質画分では特に GlcCer を含有する極性脂質画分において細胞数減少抑制作用を示し、由来の異なる GlcCer の添加は塩基構造の違いによらず全て細胞数減少を有意に抑制した。また Cer において単独の添加では細胞数が減少したが、LPS を添加した群では細胞数減少を抑制した。一方で、セラミダーゼならびにα-グルコシダーゼの阻害剤を用いたところ、α-グルコシダーゼ阻害剤である Deoxynojirimycin の投与によって GlcCer の細胞保護作用を阻害した。加えて、セラミダーゼ阻害剤の D-NMAPPD 及び N-Oleoylethanolamine の添加によって GlcCer および Cer の細胞数減少作用を阻害した。以上の結果より、GlcCer は無毒な抗炎症物質として体内に蓄積され、炎症下において Cer を経て炎症緩和作用を有する物質へと代謝される可能性を示した。

To know the food functionality and digestive property of rice GlcCer, we conducted *in vitro* digestive test and cell study using intestinal inflammation model system. Difference of rice cooking condition affected the amount of GlcCer in digestive rice juice. GlcCer fraction in rice had a potent of anti-inflammation effect this model system. Moreover, we will present the difference of sphingolipid structure and the effect of several sphingolipid-related inhivitors.

1) Aida et al., *J Oleo Sci* (2005), 2) Arai et al, *J Oleo Sci* (2015), 3) Yamashita et al, *J Oleo Sci* (2019), 4) Yamashita et al, *J Oleo Sci* (2017)

glucosylceramide, anti-inflammation, in vitro digestion

講演番号：3D02-02
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:30～ ミーティングルーム D

腸間膜リンパ節樹状細胞の抗原提示による T 細胞分化に対する乳酸菌 *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* YRC3780 の作用機序
Action mechanism of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* YRC3780 on T cell differentiation induced by antigen presentation of mesenteric lymph node dendritic cells

○中川 稜悟[1]、顧 文テイ[1]、高野 智弘[1]、王 イバイ[1]、宇野 智[1]、森永 真実子[1]、内田 健治[2]、元島 英雅[2]、片野 直哉[2]、足立（中嶋） はるよ[1]、八村 敏志[1]([1]東大院農生科・食の安全研セ、[2]よつ葉乳業・中央研)
○Ryogo NAKAGAWA[1], Wenting GU[1], Tomohiro TAKANO[1], Yimei WANG[1], Satoru UNO[1], Mamiko MORINAGA[1], Kenji UCHIDA[2], Hidemasa MOTOSHIMA[2], Naoya KATANO[2], Haruyo NAKAJIMA-ADACHI[1], Satoshi HACHIMURA[1] ([1]Res. Cent. Food Safety, Univ. Tokyo, [2]Yotsuba Milk Products)

【目的】アレルギー症状の緩和のためには，その要因である Th2 過剰応答の抑制とともに，Th2 以外の T 細胞サブセットの分化のバランス調節が重要と考えられる。本研究で用いた発酵乳ケフィア由来の乳酸菌 *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* YRC3780 株は，抗アレルギー作用が期待される乳酸菌として選抜され，シラカバ花粉症における二重盲検試験において症状緩和効果が示唆されている。本乳酸菌を経口摂取した場合に腸管免疫系に作用することを想定し，in vitro での検討を行ったところ，マウス腸間膜リンパ節（MLN）樹状細胞（DC）において，抗炎症性サイトカイン IL-10，レチノイン酸の生成に関わる RALDH2, TGF-β 活性化機能を有するインテグリンαvβ8 の遺伝子発現が増強し，MLN DC と $CD4^+$T 細胞の共培養系においては，*Gata3, Il4* などの Th2 関連遺伝子の発現が減少し，*Tbx21, Ifng* などの Th1 関連遺伝子の発現が増加した。また，Treg 誘導を促進する TGF-β の有無によって遺伝子発現の変動に違いが見られた。本研究では，培養条件や細胞単独への作用といった観点から，腸管 DC の T 細胞への抗原提示により誘導される免疫応答に対する本株の効果をより詳細に検討した。
【方法】BALB/c マウスの MLN より MLN DC として $CD11c^+$細胞を，卵白アルブミン（OVA）特異的 TCR を発現する RAG2KO/DO11.10 トランスジェニックマウスの脾臓より $CD4^+$T 細胞を，OVA 抗原ペプチド存在下，TGF-β 存在下，*L. cremoris* YRC3780 菌体存在下の条件で単独培養または共培養を行い，遺伝子発現を qPCR で解析した。また MLN DC の RALDH2 酵素活性をフローサイトメトリーで解析した。
【結果】*L. cremoris* YRC3780 菌体の添加により，MLN DC/T 細胞共培養系における TGF-β 存在下での IL-10 の遺伝子発現が増加した。また，MLN DC 単独培養における RALDH2 活性が増強された。これらのことから，*L. cremoris* YRC3780 株が腸管 DC の T 細胞への抗原提示により誘導される免疫応答に作用し，抗アレルギー作用をもたらすことが示唆された。

L. cremoris YRC3780 derived from fermented milk kefir is suggested to be effective in alleviating symptoms in a double-blind study of birch pollen allergy. For the alleviation of allergic symptoms, it is considered important to suppress excessive Th2-mediated responses and also modulate the balance of differentiation of $CD4^+$ T cell subsets. In this study, we further investigated the effects of this strain on the immune responses in the mesenteric lymph node dendritic cell (MLN-DC)/T cell culture system. Our results suggest that *L. cremoris* YRC3780 acts on the immune responses induced by antigen presentation of intestinal DCs to T cells, resulting in an antiallergic effect.

Lactococcus lactis, dendritic cell, T cell

発表責任者：八村敏志（ahachi@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3D02-03
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:30～ ミーティングルーム D

大腸腺腫発症モデルマウスにおける食用キノコ(タモギタケ)脂溶性画分が ACF 発症に与える影響
Effects of lipid fractions in edible mushroom on colon ACF formation in DMH-treated mice

○石川 愛理[1]、上田 瑠南[1]、山下 慎司[1]、松本 聡[2]、木下 幹朗[1] ([1]帯畜大、[2]LS コーポレーション)
○ Airi ISHIKAWA[1], Rumina UEDA[1], Shinji YAMASHITA[1], Satoshi MATHUMOTO[2], Mikio KINOSHITA[1] ([1]Obihiro Univ., [2]LS Corp.)

研究背景） 近年、日本を含む東アジアにおいて潰瘍性大腸炎に代表される炎症性腸疾患の増加は深刻になりつつある。これら慢性的な腸管炎症の継続は、下痢等による生活の質の低下だけでなく、大腸ガン発症リスクを上昇させる可能性が報告されている。これまでに我々の研究室ではキノコの脂溶性画分に注目し、タモギタケ(*Pleurotus citrinopileatus*)エタノール抽出物の摂取が DSS により誘導される慢性的な大腸炎症状を緩和すること [1)]、また、細胞培養試験からその効果は極性脂質画分に含まれる機能性脂質群であることを明らかにした [2)]。本研究では、同じく代表的な大腸疾患である大腸ガンに対するタモギタケ脂溶性画分の効果を検証するために、タモギタケ脂溶性各画分摂取による大腸腺腫（ACF）形成と腸管モデル細胞および大腸ガン細胞に及ぼす影響を調査した。
方法・結果） AIN-76 を基本食として、タモギタケエタノール抽出物（スリービー）由来の総脂質画分１％および２％、極性脂質画分 0.1%、中性脂質画分 0.1%混合食を調製し、試験食として 4 週齢の Balb/c マウスメスに与えた。試験食摂取 1 週間後から、Blank 群以外の 5 群に対し、ACF 誘導のため、1,2 ジメチルヒドラジン（DMH）を腹腔内投与した。DMH 投与は ACF 形成を顕著に促進した。総脂質食および極性脂質食は ACF の形成を有意に抑制したが、中性脂質食では抑制効果は確認されなかった。DMH 投与開始 8 週間後に大腸を採取し、各種分析を行った。極性脂質画分は薄層クロマトグラフィーによりセラミド(Cer)画分、ステロール画分、グルコシルセラミド(GlcCer)画分、高極性スフィンゴ脂質(HPS)画分に細分画し、細胞培養試験に供した [3)]。腸管モデル細胞である分化 Caco2 細胞に炎症刺激としてリポポリサッカライド（LPS; 50 μg/mL）処理を行うとアポトーシスが誘導され、細胞数が減少した。一方、50 μM のスフィンゴ脂質（Cer 画分、GlcCer 画分、HPS 画分）添加は細胞数減少を抑制し、その効果は極性が高くなるほど強くなった [3)]。
In this study, we investigated the effects of the lipophilic fractions from *Pleurotus citrinopileatus* (golden oyster mushroom), on aberrant crypt foci (ACF)-induced mice by treatment of 1,2-dimethylhydrazine (DMH) and differentiated Caco-2 cells treated with lipopolysaccharide (LPS) as an intestinal inflammation model. These results suggest the sphingolipids in mushroom contribute to suppression of ACF formation and colon inflammation.
1) Yamashita et al, *Mushroom Sci Biotechnol* (2020), 2) Yamashita et al, *J Oleo Sci* (2020),
3) Jutanom et al, *J Oleo Sci* (2020)

Mushroom, Aberrant crypt foci, 1,2-dimethylhydrazine

講演番号：3D02-04
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:30～ ミーティングルーム D

ロスマリン酸摂取によるアルツハイマー病予防効果に伴い変動する microRNA のミクログリアに対する機能解析

Elucidating the function of microRNA on microglia: rosmarinic acid intake increase microRNA along with a preventive effect on Alzheimer's disease

○貫間 春圭[1]、家山 智子[1]、長谷 知輝[1]、山下 玲[1]、山田 正仁[2]、三坂 巧[1]、阿部 啓子[1,3]、小林 彰子[1] ([1]東大院農、[2]金沢大院医、[3]産技総研)
○Haruka NUKIMA[1], Tomoko KAYAMA[1], Tomoki HASE[1], Rei YAMASHITA[1], Masahito YAMADA[2], Takumi MISAKA[1], Keiko ABE[1,3], Shoko KOBAYASHI[1] ([1]Univ. of Tokyo, [2]Univ. of Kanazawa, [3]KISTEC)

我々は、アルツハイマー病（AD）の主病態であるアミロイドβ（Aβ）凝集を抑制する成分として、シソ科植物に含まれるポリフェノールであるロスマリン酸（RA）を見出している。さらに、0.5% RA 含有食を 1 年間摂取した AD モデルマウス（Tg2576）を用いた行動試験と血漿および脳の microRNA（miRNA）発現変動解析の結果から、RA による認知機能改善に伴い発現上昇する miRNA の 1 つとして、miR-A を見出した。本研究では、miR-A の脳に対する機能を明らかにすることを目的とした。

標的遺伝子推定ソフト Target Scan を用いて標的遺伝子の解析をした結果、miR-A が炎症の調節に関与する MAPK カスケード上の複数の遺伝子を標的とすることが推定された。脳内で炎症を制御するミクログリアに着目した。免疫組織化学染色の結果、1 年間 RA を摂取した Tg2576 では、対照群と比較して Aβ に集積するミクログリア数が少なかった。次に、マウスミクログリア細胞株 MG6 に miR-A を過剰発現させ、LPS により炎症を惹起し、炎症応答に与える影響を評価した。miR-A 群では、ELISA において、IL-6、IL-1β 等の炎症性サイトカインの低下がみられ、RT-qPCR では、*Mapk14*、*Map2k7* 等の MAPK カスケード上の複数の遺伝子の発現低下がみられた。以上から、RA 摂取により miR-A が生成され、脳内で炎症を抑制している可能性が示された。

Performing in *in vitro* and *in vivo* studies, we found that rosmarinic acid (RA), a typical polyphenol in *Rosmarinus officinalis*, inhibited amyloid beta (Aβ) aggregation. Furthermore, we conduced behavioral tests and analysis of microRNA (miRNA) expression in the plasma and brain of Alzheimer’s disease (AD) model mice (Tg2576) fed a 0.5% RA diet for one year, and found an increase in miR-A along with a preventive effect of RA on AD. The purpose of the current study was to elucidate the function of miR-A with respect to brain. Target gene estimation software was used to analyze target genes, and it was estimated that miR-A targets multiple genes on the MAPK cascade that regulates inflammation. We focused on microglia that regulate inflammation in the brain. In the brains of mice fed a Tg2576 RA diet for one year, microglial accumulation of Aβ was lower than that in control mice, as assessed by immunohistochemical staining. Next, we overexpressed miR-A in the mice microglial cell line MG6 and investigated the effect of miR-A on LPS-induced inflammation. In the miR-A group, ELISA showed decreased expression of inflammatory cytokines, such as interleukin-6 (IL-6) and interleukin-1β (IL-1β), and RT-qPCR showed decreased expression of several genes in the MAPK cascade, such as *Mapk14* and *Map2k7*. These results indicate that miR-A is produced by RA intake and suppresses inflammation.

microRNA, Rosmarinic acid, Alzheimer's Disease

発表責任者：貫間春圭（haruka.orange523@gmail.com）

講演番号：3D02-05
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:30～ ミーティングルーム D

小腸刷子細胞におけるイメージング法の構築

Construction of in vivo imaging of intestinal tuft cells

○朝比奈 瞭[1]、楠 真友子[1]、戸田 安香[1]、安達 貴弘[2]、石丸 喜朗[1] ([1]明大農、[2]東京医科歯科大学)
○Ryo ASAHINA[1], Mayuko KUSUKI[1], Yasuka TODA[1], Takahiro ADACHI[2], Yoshiro ISHIMARU[1] ([1]Meiji Univ., [2]Tokyo Medical and Dental Univ.)

小腸上皮細胞の約 0.4%を占める刷子細胞は、60 年以上前に存在自体は明らかにされたが、その機能は長い間不明であった。近年の研究により刷子細胞は 2 型自然免疫とエネルギー代謝に関係していることが報告された（Ushima *et al.*, 2016; von Moltke *et al.*, 2016; Gerbe *et al.*, 2016; Howitt *et al.*, 2016; Sasaki *et al.*, 2019)。腸管内で寄生虫感染が起こると、刷子細胞は IL-25 を産生して 2 型自然リンパ球を活性化し､最終的に刷子細胞と杯細胞の数が増加して寄生虫を駆除する｡また、刷子細胞上に局在するコハク酸受容体 GPR91 が原虫の産生するコハク酸を受容し、感染を検知することも分かった（Weiwei *et al.*, 2018; Schneider *et al.*, 2018; Nadjsombati *et al.*,2018）が、他の寄生虫感染を検知するメカニズムは明らかになっていない。これまで刷子細胞の応答解析は主に培養細胞を用いて行われており、生体内での応答については不明である。

今回我々は、生体内での刷子細胞の応答を評価することを目的とし、情報伝達物質の一つである細胞内カルシウムイオン(Ca^{2+})の変化を可視化するイメージングシステムを構築した。この方法を用いて、刷子細胞がコハク酸に応答し、細胞内 Ca^{2+}濃度が上昇する様子が観測された。

Tuft cells, which are rare chemosensory epithelial cells, were identified about 60 years ago. However, their function has long been unknown. Recent studies have reported that tuft cells are involved in type2 immune response and energy homeostasis. Tuft cells employ a chemosensing pathway to recognize helminths and protists. When a parasite infection occurs, tuft cells activate type 2 innate lymphoid cells, and eventually the number of tuft cells and goblet cells increases to eliminate the parasites. Although tuft cells receive succinate produced by protists and detect infection, how they detect other parasite infections remain unclear. Until now, the response analysis of tuft cells has been mainly performed using cultured cells, and the response in vivo is unknown.

Here, to visualize responses of tuft cells in vivo, we established an intravital imaging system of intracellular calcium ions (Ca^{2+}). We applied this system to observe succinate-mediated Ca^{2+} signaling in tuft cells and successfully detected in a living mouse.

tuft cell, in vivo imaging, succinic acid

講演番号：3D02-06
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:30～ ミーティングルーム D

トマト種子抽出物および含有サポニンの角層セラミド合成および保湿機能に及ぼす影響

Effect of tomato seed extract and its major saponins on the synthesis of ceramides in stratum corneum and moisture retention

○竹田 翔伍、宮坂 賢知、下田 博司（オリザ油化株式会社）
○Shogo TAKEDA, Kenchi MIYASAKA, Hiroshi SHIMODA (Oryza Oil & Fat Chemical Co., Ltd.)

サポニンである lycoperoside A (LA) および H (LH) はトマト種子抽出物 (TSE) の主要成分であり，化学構造が類似した果実由来の escleoaside B には，IV型アレルギーモデルマウスにおいて抗炎症作用が報告されている。そこで本研究では，TSE および lycoperoside 類の経表皮水分蒸散（TEWL）抑制作用と抗炎症作用を，ヒト表皮 3D 培養モデルおよびアトピー性皮膚炎マウスを用いて評価した。

3D モデルのメンブレン側に TSE（1 および 10 μg/mL），LA または LH（1 および 10 μM）を添加して 3 日間培養した結果，TEWL の有意な改善，LH による角層セラミド[NP]の増加および角層セラミド合成に関与する酵素（ceramide synthase-3, glucosylceramide synthase および β-glucocerebrosidase）の発現増加が認められた。これらの結果より，TSE および lycoperoside 類は角層セラミドの合成促進により TEWL を改善することが判明した。一方，IL33-Tg マウスに皮膚炎発症前から TSE（500 mg/kg）または LH（10 mg/kg）を 101 日間経口投与した結果，ホイール運動量，炎症スコアおよび TEWL が有意に改善した。また，血中総 IgE 量，皮膚中サイトカインバランスおよび炎症性細胞の湿潤の改善が認められ， I 型アレルギー反応の改善が確認された。

これらの結果より，TSE や lycoperoside 類は角層セラミド合成の促進による TEWL 改善作用を有し，アトピー性皮膚炎による TEWL の亢進や炎症を抑制することが明らかになった。

Lycoperoside A (LA) and H (LH) are major saponins of tomato seed extract (TSE). In this study, we evaluated the effect of TSE and lycoperosides on teansepidermal water loss (TEWL) and anti-inflammatory effects in reconstructed human epidermal keratinocyte (RHEK) model and atopic dermatitis model mice.

Treatment of TSE (1 and 10 μg/mL), LA and LH (1 and 10 μM) to RHEK significantly improved TEWL and increased ceramide [NP] contents in stratum corneum in concert with up-regulation of mRNA expression of ceramide synthesis related enzymes (ceramide synthase-3, glucosylceramide synthase and β-glucocerebrosidase). Oral administration of TSE (500 mg/kg) or LH (10 mg/kg) to IL33-Tg mice significantly improved wheel rotation exercise, inflammation scores and TEWL. Furthermore, suppression of type I allergic responses, such as decrease in serum total IgE, improvement of Th2/Th1 cytokine balance and suppression of inflammatory cell accumulation, were observed. These results suggest that TSE and lycoperosides improve TEWL and inflammation caused by atopic dermatitis and enhancement of ceramide synthesis is supposed to be involved in the TEWL suppression.

lycoperoside, ceramide, atopic dermatitis

講演番号：3D02-07
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:30～ ミーティングルーム D

高度不飽和脂肪酸欠乏における肝臓の中性脂肪及びコレステロールの合成亢進と制御機構

Increased hepatic synthesis of triacylglycerol and cholesterol in highly unsaturated fatty acid deficient mice

○林 優里[1]、藤原 葉子[2,3]、市 育代[2,3] ([1]お茶大院・ライフ、[2]お茶大・基幹研究院、[3]お茶大・HLI 研)
○Yuri HAYASHI[1], Yoko FUJIWARA[2,3], Ikuyo ICHI[2,3] ([1]Grad. Sch. Life Sci., Ochanomizu Univ., [2]Fac. Core Res., Ochanomizu Univ., [3]Inst. HLI, Ochanomizu Univ.)

【背景】哺乳動物は、多価不飽和脂肪酸（PUFA）を生体内で合成できず食事から摂取する必要があるため、リノール酸などの C18PUFA は必須脂肪酸と呼ばれる。C18PUFA は不飽和化反応と炭素鎖の伸長を経て炭素数 20 以上（≥C20）の高度不飽和脂肪酸へと代謝され、免疫応答や膜機能の維持に重要な役割を果たす。FADS2 は C18PUFA から≥C20PUFA の合成における律速段階を触媒する不飽和化酵素である。本研究では、FADS2 欠損マウスに必須脂肪酸欠乏食を与えた際の≥C20PUFA の減少が肝臓の中性脂肪（TAG）及びコレステロール蓄積に与える影響を調べた。
【方法】雄性 C57BL6J 野生型マウス（WT）に通常食（CONT 食）あるいはトリパルミチンを脂質源とする必須脂肪酸欠乏食（DEF 食）を与え、4 週間飼育した（WT-CONT 群または WT-DEF 群）。FADS2 欠損マウス（KO）には DEF 食を 4 週間与えた（KO-DEF 群）。
【結果および考察】肝臓における≥C20PUFA の総量を比較すると、WT-CONT 群に比べて WT-DEF 群では≥C20PUFA が 70%程度維持されていたのに対し、KO-DEF 群では 20%以下となり、KO マウスの肝臓では高度不飽和脂肪酸が著しく減少した。そして、KO マウスの肝臓では TAG 及びコレステロールが WT の 2 群と比較して 4 倍以上に増加した。次にその要因を調べたところ、KO マウスの肝臓では脂肪酸合成に関与する転写因子 SREBP-1 の活性化と標的遺伝子の発現が増加していた。また、コレステロール合成に関わる酵素の遺伝子発現も KO-DEF 群において有意に上昇していた。しかし、これらの遺伝子の転写を制御する SREBP-2 の活性化は認められなかった。さらに、KO-DEF 群ではコレステロール合成経路のうち Bloch 経路の中間体である lanosterol や desmosterol の増加が顕著であったことから、Bloch 経路によるコレステロール合成の亢進が示唆された。以上の結果より、肝臓における高度不飽和脂肪酸の減少は TAG およびコレステロールの合成を亢進させ、脂肪肝を誘導する可能性が示唆された。

Highly unsaturated fatty acids [polyunsaturated fatty acids (PUFAs) with ≥ 20 carbons and ≥ 3 double bonds], are essential components of membranes and important for maintaining physiological functions. In this study, FADS2-deficient mice fed a PUFA-deficient diet showed the decrease of ≥C20PUFAs and hepatic accumulation of triacylglycerol (TAG) and cholesterol. The expression of genes involved in TAG and cholesterol synthesis were enhanced in FADS2-deficient mice. These results suggested that ≥C20PUFAs-deficiency enhanced the synthesis of lipids such as TAG and cholesterol, and induced hepatic steatosis.

polyunsaturated fatty acid, hepatic steatosis, cholesterogenesis

講演番号：3D02-08
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:30～ ミーティングルーム D

メチオニン低減、コリンの欠乏が非アルコール性脂肪性肝疾患モデルマウスのリポプロテインプロファイルに及ぼす影響

The effect of methionine-reduction and choline deficiency on the lipoprotein profile of nonalcoholic fatty liver disease model mouse

○川手 啓吾[1]、小坂 浩輝[1]、三浦 徳[3]、増澤（尾崎）依[2]、細野 崇[1,2]、関 泰一郎[1,2,3]（[1]日大院・生資科・応生科、[2]日大・生資科・生命化、[3]日大院・生資科・総合研究所）

○Keigo KAWATE[1], Hiroki KOSAKA[1], Atsushi MIURA[3], Yori OZAKI-MASUZAWA[2], Takashi HOSONO[1,2], Taiichiro SEKI[1,2,3] ([1]Nihon Univ. Grad. School, [2]Nihon Univ, [3]Nihon Univ. General Research Institute)

【目的】飲酒歴がないにもかかわらず肝臓に脂肪が蓄積する非アルコール性脂肪肝（NAFL）は、肝硬変や肝がんへと進行する。これらは非アルコール性脂肪性肝疾患（NAFLD）と総称される。NAFLD の動物モデルの作製に使用されるメチオニン低減コリン欠乏高脂肪飼料（CDAHFD）は、超低密度リポタンパク質（VLDL）の形成を阻害することで肝臓からの脂質排出を低下させ、脂肪肝を引き起こすと考えられているが、その詳細は不明である。本研究では、CDAHFD 給餌マウスの肝臓脂質蓄積、血漿リポタンパク質組成にメチオニンやコリンが及ぼす影響について検討し、NAFLD の発症メカニズムを解明することを目的とした。【方法】C57BL/6J マウスに CDAHFD（メチオニン低減コリン欠乏 45% kcal ラード含有高脂肪食）、メチオニン低減高脂肪食（MRHFD）、コリン欠乏高脂肪食（CDHFD）、高脂肪食（HFD）を一定期間給餌し、血漿や肝臓を回収し、各種生化学的な解析を行った。【結果】CDAHFD 給餌により肝臓中のトリアシルグリセロール（TG）は高値を示したが、MRHFD や CDHFD では HFD と同程度であった。CDAHFD 給餌マウスでは肝臓の脂肪変性、脂質合成関連遺伝子の発現増加が観察された。HFD, CDHFD では VLDL 画分に TG が検出されたが、MRHFD, CDAHFD ではより小型の低密度リポタンパク質（LDL）画分に検出された。以上の結果より、肝臓の脂質蓄積にはメチオニンとコリンの両方の低減が必要であること、CDAHFD, MRHFD 給餌マウスでは TG が LDL により輸送される可能性が明らかになった。

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is a spectrum of liver disorders with no alcohol consumption. The methionine-reduced choline-deficient high-fat diet (CDAHFD) is used to produce animal model of NAFLD; CDAHFD reduces lipid excretion from the liver by inhibiting VLDL assembling. In this study, we investigated the effects of methionine and choline deficiency on hepatic lipid accumulation and plasma lipoprotein composition to elucidate the pathogenic mechanism of NAFLD. CDAHFD,methionine-reduced high-fat diet (MRHFD), choline-deficient high-fat diet(CDHFD), and high-fat diet(HFD) were given to C57BL/6J mice. CDAHFD feeding increased the expression of lipogenic genes. TG was detected in the VLDL fraction in HFD and CDHFD, but it was detected in the smaller LDL fraction in MRHFD and CDAHFD. These results suggest that hepatic lipid accumulation requires low levels of both methionine and choline, and that TG is transported by LDL in CDAHFD and MRHFD-fed mice.

lipid metabolism, lipoprotein, NAFLD

発表責任者：関　泰一郎（seki.taiichirou@nihon-u.ac.jp）

講演番号：3D02-09
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:30～ ミーティングルーム D

腸肝循環における 12α水酸化胆汁酸の増加による腹腔内耐糖能試験でのインスリン分泌減少

An increased enterohepatic 12α-hydroxylated bile acid circulation reduces insulin secretion during intraperitoneal glucose tolerance tests in rats.

○横山 史佳、吉次 玲香、石塚 敏（北海道大学農）
○Fumika YOKOYAMA, Reika YOSHITSUGU, Satoshi ISHIZUKA (Hokkaido Univ.)

背景）先行研究において、脂質吸収に寄与する一次胆汁酸であるコール酸（CA）をラットに与え、11 週後に腹腔内グルコース負荷試験（IPGTT）を実施すると、血中グルコース濃度に群間差はない一方でインスリン濃度が CA 群で有意に低下した。この結果は、CA によるインスリン感受性の亢進を示唆する。そこで本研究では再現性の確認とインスリン負荷試験（ITT）によるインスリン感受性の評価を行った。
方法）WKAH/HkmSlc 雄性ラット(3,4 週齢)を、AIN-93G 準拠の飼料を与えたコントロール群（C 群）または CA（0.5 g/kg 飼料）群に分けて飼育し、6 週後と 8 週後に IPGTT と ITT をそれぞれ実施した。各試験に応じて、血中のパラメーターとしてグルコース、インスリン、トリグリセリド、遊離脂肪酸、コレステロールの測定を適宜実施した。
結果と考察）IPGTT ではグルコース濃度に群間差がない一方、CA 群でインスリン濃度の低下傾向、ITT ではグルコース濃度曲線下面積の有意な減少を観察した。また、遊離脂肪酸やコレステロール濃度に群間差がない一方で TG 濃度が CA 群で有意に低下した。これらの結果から、グルコース代謝およびリポタンパク質代謝に関するインスリンの作用を CA が調節する可能性が示された。

In our previous study, we performed intraperitoneal glucose test (IPGTT) at week 11 in rats fed with a diet containing CA, which is primary bile acid contributing to lipid absorption. A significant reduction was observed in plasma insulin level in the CA-fed rats regardless of no significant difference in plasma glucose level, suggesting improvement of insulin sensitivity by the CA supplementation. The aim of this study is to confirm reproducibility of the results with evaluation of insulin sensitivity in insulin tolerance test (ITT).

Male WKAH/HkmSlc rats (3- or 4-week-old) were divided into two dietary groups such as control diet (AIN-93G based) and the CA-containing diet (0.5 g/kg diet). IPGTT and ITT were performed at week 6 and 8 after the grouping, respectively. We measured plasma parameters such as glucose, insulin, triglyceride (TG), free fatty acid (FFA), and cholesterol depending on the tests.

Plasma insulin in IPGTT tended to decrease in CA-fed rats despite no difference in the glucose levels. Area under curve of glucose decreased significantly in CA-fed rats in ITT. Furthermore, TG level decreased significantly. These results suggested a possibility that CA modulates the effect of insulin on glucose and lipoprotein metabolism.

12α-hydroxylated bile acid, intraperitoneal glucose tolerance tests, insulin

講演番号：3D02-10
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:30～ ミーティングルーム D

微生物由来プラスマローゲンのラット小腸におけるリンパ吸収動態

Lymphatic absorption of microbial plasmalogen in the small intestine of rats

○佐藤 奈々[1]、金濱 晶[1]、柏木 明子[2]、山田 美和[1]、西向 めぐみ[1]([1]岩手大・農、[2]弘前大・農学生命)
○Nana Sato[1], Aki Kanehama[1], Akiko Kashiwagi[2], Miwa Yamada[1], Megumi Nishimukai[1] ([1]Iwate Univ., [2]Hirosaki Univ.)

【目的】プラスマローゲン (Pls) は、ビニルエーテル結合を有するエーテル型リン脂質であり、動物体内に広く存在している。また、Pls は抗酸化作用を示すため、酸化ストレスが関与する人間の疾病との関連が示唆されている (M. Nishimukai et al., Clin Chim Acta. 2014)。しかし、Pls に結合している脂肪酸の違いが Pls の生理機能に影響を及ぼすかどうかといった構造･機能間の情報は少ない。そこで我々は、*Selenomonas ruminantium* の Pls には、動物由来 Pls よりも短鎖の脂肪酸が結合していることに着目した (T. Watanabe et al., J. Gen. Appl. Microbiol., 1982)。本研究では、微生物由来 Pls の動物における生理機能解明を目指し、ラット小腸における微生物由来 Pls の吸収動態について検討した。
【方法】9～10 週齢の Wistar/ST 系の雄ラットを、AIN93-G に準拠した基本食で 3 日間予備飼育後、胸管リンパ管 (リンパ液採取用) と十二指腸 (経腸投与用) にカテーテルを留置した。一晩回復後、ブタ脳由来 Pls (Control 群) または微生物由来 Pls (BacPls 群)含有脂質エマルジョン 1 ml を経腸投与し、経時的にリンパ液を全量採取した。脂質投与前および投与後の各リンパ液は、脂質抽出を行なった後に、LC-MS/MS を用いてリンパ液中の Pls の分子種分析を行った。
【結果と考察】Control 群では、リンパ液中のエタノールアミン型 Pls (PlsEtn) 量は脂質投与後継時的に、コリン型 Pls (PlsCho) 量は投与後 2 時間以降に増加し、リンパ液に放出された Pls の *sn*-1 位には、ブタ脳 Pls に主要な炭化水素鎖の 16:0、18:0、18:1、*sn*-2 位にはラットに主要な 20:4 の脂肪酸が主に結合していた。BacPls 群では、リンパ液中の PlsEtn 量は投与 2 時間後、PlsCho 量は投与 4 時間後で最大となり、リンパ液に放出された Pls の *sn*-1 位には、微生物由来 Pls に特異的な 16:1 の脂肪酸、*sn*-2 位にはラットに主要な 20:4 の脂肪酸が主に結合していた。以上より、Pls は小腸上皮細胞で吸収後、*sn*-1 位は投与された Pls の脂肪酸を、*sn*-2 位はラットの主要脂肪酸を再結合してリンパ液へ放出されており、微生物由来 Pls の *sn*-1 位は微生物に特異的な構造を維持して体内へ吸収されることが示された。また、投与した PlsEtn の一部は、小腸上皮細胞内で PlsCho へ変換されることも示唆された。
We carried out duodenal infusion of emulsion including the lipid extracted from *Selenomonas ruminantium* in the lymph duct-cannulated rats. Analysis of lymphatic plasmalogens (Pls) of rat after lipid injection suggested that *sn*-1 position was reflected by specific species in the microbial Pls but *sn*-2 position was resynthesized as main species in lymphatic Pls of rats. In addition, part of the injected microbial ethanolamine Pls were changed into choline Pls in the lymph of rats.

plasmalogen, *Selenomonas ruminantium*, lymphatic absorption

発表責任者：西向　めぐみ（nmegumi@iwate-u.ac.jp）

講演番号：3D02-11
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:30～ ミーティングルーム D

ブルーベリー葉抽出物のα-アミラーゼ阻害物質の探索

α-amylase inhibitory substances derived from blueberry leaf extract

○松本 悠[1]、矢野 善久[1]、山﨑 正夫[2]、藤田 裕之[1]([1]京都先端科学大学バイオ環境、[2]宮崎大学農)
○Haruka MATSUMOTO[1], Yoshihisa YANO[1], Masao YAMASAKI[2], Hiroyuki FUJITA[1] ([1]Kyoto University of Advanced Science, [2]Univ. Miyazaki)

(目的)近年、食品による生活習慣病の改善作用について多くの検討がなされている。我々は、ブルーベリー葉にα-アミラーゼを強力に阻害することを見出しており、実際にラットに対し、デンプンとブルーベリー葉抽出エキスを同時に強制経口投与することにより、血糖上昇抑制作用を示すことを確認している。そこで、本酵素を阻害する物質の単離・構造決定することを目的とした。
(方法)実験サンプルには宮崎大学より提供されたブルーベリー葉エキスを使用した。α-アミラーゼ阻害活性は、ブタ膵臓由来のα-アミラーゼを用い、可溶性デンプンから遊離する還元糖量を、3,5-ジニトロサリチル酸により発色、定量した。阻害物質の精製・単離は、ODS のオープンカラムにより、MeOH の段階溶出し、得られた活性画分をさらに逆相系 HPLC により分画した単離した活性画分は、LC-MS、GC-MS、NMR により物質の構造解析を行った。
(結果及び考察)ODS オープンカラムによる分画では、30%溶出画分に最も強力な阻害活性を示した。この画分を HPLC-ODS カラムにより分画した結果、25 本のフラクションが得られ、そのうち最も活性の強かった画分を、5-Ph カラムにより分画し、2 つの活性ピークに単離した。これらのフラクションを、各種機器分析により解析を行った結果、1 つの画分は、3-O-caffeoyl-5-O-p-coumaroylquinic acid と推定した。さらに、もう一つの画分は、^{1}H-NMR による解析の結果、脂肪酸モノグリセリドと推定され、GC-MS 分析を行った結果、パルミチン酸及びステアリン酸のモノグリセリドであることがわかった。今回単離した化合物は、いずれも既知物質ではあったが、α-アミラーゼ阻害作用を示すことを見出すことができた.

Blueberry leaves extract (BLE) was strongly inhibits α-amylase, suppressed blood glucose elevation by starch after oral administration with rats at the same time. Then, we aimed to isolate and determine the structure of substances that inhibit this enzyme.

For purification of the inhibitory substances in BLE, fractionated with an open column of ODS with MeOH stepwise elution, and further fractionated was used RP-HPLC. The isolated active fractions were analyzed by LC-MS, GC-MS and NMR.

After RP-HPLC (ODS, 5Ph columns) purification, we obtained from BLE two active fractions, one was presumed 3-O-caffeoyl-5-O-p-coumaroylquinic acid, the other was presumed glycerol-monopalmitate, and -monostearate.

blueberry leaf extract, α-amylase inhibitor, anti-hyperglycemic effect

発表責任者：藤田裕之（fujita.hiroyuki@kuas.ac.jp）

講演番号：3D02-12
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:30～ ミーティングルーム D

硫酸化糖脂質代謝に与える短鎖脂肪酸の影響

Effect of short-chain fatty acid on sulfated glycolipid metabolism

○中嶌 岳郎[1]、中田 勉[2]、田中 直樹[1] ([1]信州大医、[2]信州大基盤研究支援センター)
○Takero NAKAJIMA[1], Tsutomu NAKADA[2], Naoki TANAKA[1] ([1]Shinshu Univ., [2]Shinshu Univ. RCSAS)

硫酸化糖脂質（スルファチドおよびセミノリピド）は脳・精巣などに多量に発現し、神経鞘の構築と精子形成に必須であることが報告されている。一方、硫酸化糖脂質の発現を増やす物質、そしてそのメカニズムは全く不明である。

今回我々は、短鎖脂肪酸の一種である酪酸が、硫酸化糖脂質の生合成を強力に促進させることを見出した。ヒト由来汎用細胞株 HEK293 及び HepG2 を 0 - 5mM 酪酸ナトリウム存在下で 24 時間培養したところ、硫酸化糖脂質合成酵素をコードする *GAL3ST1* 遺伝子の発現量が濃度依存的に増加した。また、硫酸化糖脂質の一種、スルファチドの細胞内含量は酪酸ナトリウム処理によって増加した。以上の作用は、塩化ナトリウムあるいは酢酸ナトリウムで処理した細胞には見られず、酪酸に特異的な作用であることが示唆された。酪酸の生理活性が最近注目されているが、酪酸が *GAL3ST1* の誘導を介して硫酸化糖脂質の産生を増加させているという意外な結果が得られた。現在、*GAL3ST1* の誘導に関するメカニズムを解析中である。

Sulfated glycolipids (sulfatide and seminolipid) are highly expressed in the brain and testis, where they are essential for myelin sheath construction and spermatogenesis. However, substances that increase the expression of sulfated glycolipids, as well as their mechanisms, are largely unknown.

Here, we show that butyric acid, a type of short-chain fatty acid, strongly promotes the generation of sulfated glycolipids. Treatment of HEK293 and HepG2 cells with 0 – 5 mM of sodium butyrate for 24 hours resulted in a concentration-dependent increase in the expression of *GAL3ST1* gene encoding sulfated glycolipid synthase. In addition, sodium butyrate treatment increased the cellular contents of sulfatide, a type of sulfated glycolipids. These effects were not observed in cells treated with either sodium chloride or sodium acetate, suggesting butyrate-specific actions. While the bioactivity of butyrate has recently attracted attention, we uncovered a novel biological action of butyrate; that is, butyrate promotes sulfated glycolipid production through the induction of *GAL3ST1*. Currently, we are investigating the mechanism related to the induction of *GAL3ST1*.

SCFA, butyrate, sulfatide

発表責任者：中嶌岳郎（nakat@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：3D02-13
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:30～ ミーティングルーム D

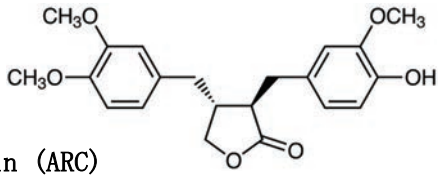
Arctigenin、Nobiletin による相乗的抗腫瘍活性の分子機構の解明

Study of the molecular mechanism of synergistic antitumor activity by Arctigenin and Nobiletin

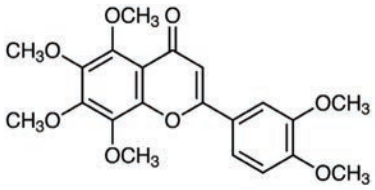
○仲宗根 侑花、岩崎 公典、屋 宏典 (琉球大学)
○Yuka NAKASONE, Hironori IWASAKI, Hirosuke OKU (Univ. of the Ryukyus)

食品中の機能性成分は薬剤と異なり、それらの相互作用についてはほとんど未解明である。我々は食品の機能性においてそれらの相互作用は無視できないと考え、スクリーニングの段階から相互作用を視野に入れた機能性成分、特に抗腫瘍活性成分の探索をすすめてきた。

正常細胞（WI-38）と腫瘍細胞（A549）を用いて、細胞内還元反応を定量化する MT Sassay によるスクリーニングを行った結果､約 400 種の生薬から Arctigenin(ARC) と Nobiletin(NOB) を見出した。両分子はそれぞれ 2.5μM 以上で併用した場合に相乗的に作用することを明らかにしている。



Arctigenin (ARC)



Nobiletin (NOB)

この相乗作用は､① 一部の腫瘍細胞に特異的な現象であること､② 細胞毒性や増殖阻害ではなく、代謝抑制であることを明らかにした。代謝抑制におけるそれぞれの成分の関与を明らかにする実験の結果、ARC は ATP 合成量を抑制し、NOB は細胞内グルコース代謝を抑制していることが明らかになった。また、ARC 濃度を 80μM まで増大すると細胞毒性が認められるが、この細胞毒性には NOB は関与しておらず、ARC には細胞毒性作用とは別の栄養代謝抑制作用があることが示唆された。本講演ではこれらの細胞選択的な相乗作用の詳細について報告する。

It is important to discuss interactions in assessing functional ingredients from food. We are conducting research to screen only the synergistic functionality and to clarify the action mechanism.
In this lecture, the synergistic metabolic inhibition of Arctigenin(ARC) and Nobiletin(NOB) is reported. This inhibition of metabolism has been shown to be specific to tumor cells. Since no cytotoxicity was observed under the present experimental conditions, it is expected to provide important information for understanding the nutritional metabolic pathway specific to tumor cells.

Anti-tumor, Synergistic effect, Functional food components

発表責任者：岩崎公典（hiwasaki@comb.u-ryukyu.ac.jp）

講演番号：3D02-14
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:30～ ミーティングルーム D

仏手柑由来クマリン類のアポトーシス誘導物質とその作用機構

Apoptosis induce of coumarins from *Citrus medica* L. var. *sarcodactylis* and there mechanism

○夏見 弥侑、奥野 祥治（和歌山高専）
○Miyu NATSUMI, Yoshiharu OKUNO (NIT, Wakayama College)

がんは日本人の最も多い死因であり、各種のガン疾患に対して新たな抗がん剤の開発が行われている。がん治療の有効な手段としてがん細胞に対するアポトーシス誘導があり、副作用の少ないがんの治療や予防効果が期待できると考えられている。アポトーシスとは炎症を伴わない制御された能動的な細胞死のことである。近年、植物などから多くのアポトーシス誘導物質が報告されており、本研究室でも梅や山椒など多くの植物から胃がん細胞に対するアポトーシス誘導物質を見出している。

仏手柑 (*Citrus medica* L.var. *sarcodactylis*) はミカン科ミカン属の香酸柑橘類であり、インドが原産のシトロンの変種であると言われている。日本では和歌山県、鹿児島県で年間約 2 トン程度生産されている。我々は仏手柑に含まれる機能性成分の研究の一環として、胃がん細胞 MKN45 に対する増殖抑制効果を検討した結果、強い抑制物質としてクマリン類である Scopoletin (**1**) を単離、構造決定し、昨年度の農芸化学会で発表した。

本研究では、Scopoletin (**1**)とその誘導体の MKN45 に対する細胞増殖抑制およびアポトーシス誘導効果における構造活性相関およびその作用機構について検討した。

Apoptosis is cell death to controlled by gene and does not involve inflammation. Cancer is caused by various factors and is the most cause of death in Japan. Inducing apoptosis to cancer cells is considered the one of effective cancer preventions and treatments. Previously, we have found apoptosis-inducing compounds for cancer cells form *Prunus mume* Sibe *et. Zucc*, and *Zanthoxylum piperitum*.

Citrus medica L. var. *sarcodactylis* belongs to be the genus Citrus (Rutaceae), plant of incense acid citrus fruits. In Japan, it's produced in Wakayama and Kagoshima prefectures. In our search for functional components in *C. medica*, scopoletin (**1**) was isolated and identified as growth inhibitory compound against human gastric cancer cell line MKN-45.

In this study, we investigated the structure and activity relationship of scopoletin and its derivative compounds on cell growth inhibitory and apoptosis inducing activity against MKN-45 cell. In addition, the mechanism of apoptosis inducing by active compounds were investigated.

Citrus medica L. var. *sarcodactylis* , apoptosis, coumarin

講演番号：3D02-15
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:30～ ミーティングルーム D

食品由来機能性微粒子 EPDENs の乳がん抑制作用と活性成分の探索

Anti-tumor effect of Edible Plant Derived Exosome-like Nanoparticles in MCF-7 human breast cancer cells and Search for active components

○山崎 有美[1]、松本 朋子[2]、福井 敬一[3]、吉山 佳世[3]、近藤 知巳[3]、山崎 正夫[4]([1]宮大地域、[2]宮大産学、[3]JA 宮経連、[4]宮大農)

○Yumi YAMASAKI[1], Tomoko Matsumoto[2], Keiichi Fukui[3], Kayo Yoshiyama[3], Tomomi Kondo[3], Masao Yamasaki[4] ([1]Univ. Miyazaki, Reg., [2]Univ. Miyazaki, CRCC, [3]JA Mz-kei, [4]Univ. Miyazaki, Agr.)

本研究では、カラーピーマンより植物性食品に含まれるエクソソーム様のナノ粒子(Edible Plant Derived Exosome-like Nanoparticles ;EPDENs)を分離し、乳がん抑制作用について評価した。また、その活性成分の探索を行った。

試験で使用した赤色、橙色、黄色のカラーピーマン由来 EPDENs は、超遠心法により取得した。乳がん抑制作用の評価では、細胞播種密度 5.0 x 10^4cells/mL、5%FBS-DRPMI 1640 培地で 24 時間培養したヒト乳がん細胞株 MCF-7 に、10%濃度の EPDENs を処理し 48 時間培養後、細胞増殖/細胞毒性測定用試薬 Cell Counting Kit-8 を用いて生細胞数を測定した。その結果、3 種類のパプリカ由来 EDPENs 全てにおいて 5%の危険率で有意に MCF-7 細胞の増殖抑制が認められた。次に、各カラーピーマン由来 EPDENs のカロテノイドを、日本食品標準成分表 2015 年度版（七訂）分析マニュアルに準じて抽出し、UPLC/MS による精密定量分析を行った。その結果、3 色のパプリカ由来 EPDENs には、複数の種類のカロテノイドが含まれていることが明らかとなった。

We have revealed that Edible Plant Derived Exosome-like Nanoparticles from paprika (*Capsicum annuumL.*) with different colors, had anti-tumor effect. In addition, we have searched for active components from these EPDENs.

In this research, we have used red, orange, and yellow color paprikas, and EPDENs were obtained from each color paprika by ultracentrifugation. Human breast cancer MCF-7 cells were inoculated at 5.0 x 10^4 cells/ml, cultured in RPMI-1640 medium supplemented with 5% FBS, at 37°C in a humid atmosphere containing 5% CO2. These cells were cultured in the presence of some EPDENs or vehicle (phosphate buffered saline (PBS)) for 48h. After incubation, the cell viability was assayed with a CCK‐8 Kit. In this study, we have found that all three paprika-derived EPDENs significantly suppressed MCF-7 cell proliferation. Next, the carotenoids of EPDENs derived from each color paprika were extracted according to the analysis manual of standard tables of food composition in Japan 2015 (Seventh Revised Version). The amount of carotenoids contained in EPDENs was subjected to precise quantitative analysis by UPLC / MS. As a result, it was clarified that EPDENs derived from 3 color paprikas contain multiple types of carotenoids.

EPDENs, anti-cancer, carotenoids

発表責任者：山崎有美（yamasakiy@cc.miyazaki-u.ac.jp）

講演番号：3D02-16
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:30～ ミーティングルーム D

サツマイモ焼酎粕を用いた麹菌培養物の抽出物によるがん細胞致死作用

Cancer cell killing property of extracts from *koji* mold cultured in sweet potato-*shochu* derived distillery by-product

○小境 敏揮[1]、三浦 真帆[2]、竹下 美愛[2]、章 超[1]、河野 邦晃[1]、小川 健二郎[3]、甲斐 久博[4]、西山 和夫[2]、山﨑 正夫[2]（[1]霧島酒造、[2]宮崎大・農、[3]宮崎大・テニュアトラック推進機構、[4]九保大・薬）
○Toshiki KOSAKAI[1], Maho MIURA[2], Michika TAKESHITA[2], Cho SHO[1], Kuniaki KAWANO[1], Kenjiro OGAWA[3], Hisahiro KAI[4], Kazuo NISHIYAMA[2], Masao YAMASAKI[2] ([1]Kirishima Shuzo Co., Ltd., [2]Grad. Sch. of Agric., Univ. of Miyazaki, [3]Organization for Promotion of Tenure Track, Univ. of Miyazaki, [4]Sch. of Pharm. Sci., Kyushu Univ. of Health and Welfare)

≪目的≫

我々はこれまでに、麹菌をサツマイモ焼酎粕の液体部分を用いて培養して得られた麹菌培養物（FPs）について、マウスを用いた動物実験により体重増加抑制作用や血清コレステロール低下作用を有すること[1]、腸内細菌叢が変化すること[2]を明らかにしてきた。本研究では、FPs の抽出物を用いてがん細胞致死作用及び作用機序について検討した。

≪方法・結果≫

ヒト前骨髄性白血病細胞 HL-60 を用いて、がん細胞致死作用に関して評価したところ、FPs のクロロホルム-メタノール抽出物で顕著に活性が高かった。さらにシリカゲルで分画し、各画分についても同様に評価した結果、画分 6 のみで細胞増殖抑制作用及び細胞致死活性が認められた。アポトーシスの評価では、DNA の断片化と核の形態異常が観察され、アネキシン-V 及び PI に陽性の細胞集団が有意に増加した。しかし、アポトーシス関連タンパクの網羅的解析の結果では、ヘムオキシゲナーゼ-1（HO-1）のみ発現が上昇した。

1) 小境ら，2018 年度日本農芸化学会大会
2) 小境ら，2020 年度日本農芸化学会大会

Previous study suggested that dietary intake of fermented products (FPs) made from *koji* mold and sweet potato-*shochu* derived distillery by-product showed various effects. In present study, the effect of FPs extract on the cancer cell killing activity was investigated using HL-60 human leukemia cells. Strongest cell killing activity was observed when cells were treated with lipid extract of FPs. After the fractionation by silica gel, Fraction 6 from the lipid extract of FPs induced apoptosis-like behavior as characterized by nucleosomal DNA fragmentation and Annexin V/PI assay. We are evaluating further molecular mechanisms of lipid extract.

koji, anti-cancer, HL-60

発表責任者：山崎正夫（myamasaki@cc.miyazaki-u.ac.jp）

講演番号：3D02-17
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:30～ ミーティングルーム D

がん細胞増殖におけるベリーの影響分析

Analysis of effect of berries on cancer cells growth

○鈴木 晶貴[1]、水木 徹[2]、三浦 健[1,3]（[1]東洋大院生命科学、[2]東洋大学・バイオナノエレクトロニクス研究センター、[3]東洋大学・ライフイノベーション研究所）
○Aki SUZUKI[1], Toru MIZUKI[2], Takeshi MIURA[1,3] ([1]Graduate School of Life Science, Toyo University, [2]Bio-Nano Electronics Research Centre, Toyo University, [3]Institute of Life Innovation Studies, Toyo University)

【背景・目的】現在、ベリーがもたらす健康効果は世界中で研究が行われ、その成分や機能が解明されてきた。その中でも、ベリー成分であるアントシアニンはがんを抑制する効果を持つと報告がされている。3 種のベリーの交配種であるボイセンベリーは、健康効果を持つ成分を多く含み、高い機能性が期待されており、アントシアニンは 4 種（Cyanidin-3-glucoside chloride、Cyanidin-3-rutinoside chloride、Cyanidin-3-sophoroside chloride、Cyanidin-3-(2^{G}-glucosylrutinoside chloride）と豊富に含んでいる。本研究では、ボイセンベリー乾燥粉末および、各含有アントシアニンががん細胞の生育に及ぼす影響を解析することを目的とした。
【結果・考察】結腸がん細胞（DLD-1）にボイセンベリー、ブルーベリー、ラズベリー、ブラックベリー粉末溶液を添加し細胞の生存率を算出したところ、ボイセンベリーが最もがん細胞の増殖を抑制した。また、アントシアニン混合溶液の添加でも増殖の抑制が見られ、このことから、ボイセンベリー及び含有アントシアニンは、高いがん細胞増殖抑制効果を持つことが確認できた。また、ボイセンベリー添加後の、アポトーシス誘導作用と細胞周期への影響を解析したところ、後期アポトーシスの誘導と、細胞周期への影響も見られた。

【Background and Purpose】The health benefits of berries have drawn attention around the world and their component and function have been studied, especially, anthocyanins, that are one of berry components and have antioxidant activity, have been currently known that they have cancer growth inhibition effect. Since boysenberry, is a hybrid of three berries, contains a lot of components including 4kinds of anthocyanins, it is expected to have health beneficial functions. The purpose of this study is to analyze the effect of the components, especially each anthocyanin, extracted from boysenberry on the growth of cancer cell.

【Result and Discussion】We have demonstrated that the components extracted from boysenberry have a stronger growth inhibition effect on DLD-1, that is a colorectal adenocarcinoma cell lines, than those of blueberry, raspberry and blackberry.

Apoptosis induction and cell cycle manipulation have been confirmed on DLD-1 cultured in a medium supplemented with boysenberry component. The details of the anti-cancer growth activity of the components and anthocyanins extracted from boysenberry will be explained and their dependence on antioxidant activity will be discussed at the presentation.

berry, anthocyanin, anti-cancer growth effect

発表責任者：鈴木晶貴（s39102010028@toyo.jp）

講演番号：3D04-01
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:30～ ミーティングルーム D

OVA 特異的 T 細胞クローンマウスを用いた経口抗原に対する CD4+T 細胞応答の解析

Analysis of the CD4+ T cell response to oral antigen using cloned mice generated from OVA-specific T cells

○塩原 幸[1]、五島 直樹[1]、王 イバイ[1]、中川 稜悟[1]、曽我 皓平[1]、王 蓉[1]、神沼 修[2]、足立（中嶋）はるよ[1]、八村 敏志[1] ([1]東大院農生科・食の安全研セ、[2]広大・原医研)

○Miyuki SHIOBARA[1], Naoki GOTO[1], Yimei WANG[1], Ryogo NAKAGAWA[1], Kohei SOGA[1], Rong WANG[1], Osamu KAMINUMA[2], Haruyo NAKAJIMA-ADACHI[1], Satoshi HACHIMURA[1] ([1]Res. Cent. Food Safety, Univ. Tokyo, [2]Res. Inst. Rad. Biol. Med., Hiroshima Univ.)

【目的】卵白アルブミン（OVA）特異的 T 細胞クローンマウスは、OVA 特異的な CD4+T 細胞をドナーとし、核移植によって作出された。本マウスの CD4+T 細胞では、ドナーT 細胞由来 T 細胞レセプター（TCR）α および β 鎖遺伝子が再構成された抗原特異的 TCR が発現している。本マウス（およびその子孫）は経口摂取抗原に対する CD4+T 細胞応答を解析できるモデルとなる可能性がある。このような背景から、本マウスの CD4+T 細胞の抗原に対する応答性を評価した。

【方法】ドナー由来再構成 TCR αβ 鎖を発現するマウスと BALB/c マウスの交配により作出した、再構成 TCR αβ、α あるいは β を発現するマウス（以下それぞれ αβ、α、β クローンマウス）および野生型マウス、BALB/c マウスを用いた。BALB/c マウス腸間膜リンパ節（MLN）より MLN 樹状細胞(DC) として CD11c+細胞、クローンマウスの脾臓より CD4+ T 細胞を、それぞれ MACS 法により精製し、OVA、OVA 抗原ペプチドとともに共培養を行った。また、クローンマウスに卵白食を 12 日間摂取させ、脾臓および MLN 細胞を、OVA、または OVA 抗原ペプチドと培養した。培養上清中におけるサイトカイン産生を ELISA によって定量した。

【結果】MLN DC と CD4+T 細胞の共培養系において、抗原ペプチド添加により IL-4 産生が、OVA 添加により IFN-γ 産生が αβ、β クローンマウスにおいて有意に増加した。また、卵白食投与された αβ クローンマウスの脾臓細胞での IL-4 の産生が有意に増加した。これらのことから、OVA 特異的 T 細胞クローンマウスは、経口摂取 OVA に対してドナー由来 TCR により応答し、経口抗原に対する CD4+T 細胞の応答性を解明するための有効な実験系であることが示唆された。

[Background] Cloned mice generated by nuclear transfer of ovalbumin (OVA)-specific T cells express OVA-specific TCR and may be useful to evaluate responses to oral antigen. **[Methods]** MLN DCs of BALB/c mice and CD4+ T cells from splenocytes of these cloned mice were cocultured in the presence of antigen. Cloned mice were fed egg-white diet for 12 days. Splenocytes and MLN whole cells were cultured with antigen, and cytokine concentrations (IL-4 and IFN-γ) in supernatants were measured by ELISA. **[Results]** The productions of IL-4 and IFN-γ from CD4+ T cells of αβ and β cloned mice were significantly increased by antigenic stimulation. In addition, IL-4 production from splenocytes of egg-white diet fed αβ cloned mice was increased. Our data indicated that this cloned mouse is an efficient model to evaluate T cell reactivity to oral antigen.

cloned mouse, intestinal immunity, T cells

発表責任者：八村敏志（ahachi@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3D04-02
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:30～ ミーティングルーム D

脂肪細胞の分化・成熟を抑制するマスト細胞由来因子の特性

Characterization of a soluble factor from mast cells which suppresses adipocyte differentiation/maturation

○祖父江 春菜、高野 真衣、細萱 侑作、中西 祐輔、高橋 恭子 (日本大生物資源科)
○Haruna SOBUE, Mai TAKANO, Yusaku HOSOGAYA, Yusuke NAKANISHI, Kyoko TAKAHASHI (Nihon Univ.)

マスト細胞はアレルギー炎症を誘導することで知られるが、近年その多彩な生理機能が注目されている。脂肪組織中にマスト細胞が存在することに着目し、これまでに、マスト細胞が脂肪細胞の分化・成熟に対して促進作用と抑制作用の両方を示し、促進作用は両細胞の物理的接触に、抑制作用はマスト細胞が産生する液性因子に依存することを報告した。本研究では、脂肪細胞の分化・成熟を抑制するマスト細胞由来の液性因子の特性を明らかにすることを目的とした。マウス骨髄由来マスト細胞(BMMC)の培養上清を調製し、限外濾過、加熱処理、酵素処理をそれぞれ行った。マウス線維芽細胞株 3T3-L1 の脂肪細胞への分化誘導系を用い、無処理および各処理をおこなった BMMC の培養上清を添加し、Adiponectin, GLUT4, aP2 の mRNA 発現を指標に脂肪細胞の成熟に及ぼす影響を解析した。その結果、>100kDa の培養上清画分を使用した場合には抑制作用を示したのに対し、<50kDa 画分、50-100kDa 画分には顕著な抑制作用が認められなかった。また、65℃30 分の加熱処理をおこなうことにより抑制作用の低減が観察された。一方、ベンゾナーゼ処理は抑制活性に影響を及ぼさなかった。これらの結果から、脂肪細胞の分化・成熟に対して抑制作用を示すマスト細胞由来の液性因子は、熱感受性を持つ、100kDa 以上の核酸ではない高分子であると考察している。

The various physiological roles of Mast cells have been attracting attention in recent years. Focusing on the presence of mast cells in adipose tissue, we previously reported that mast cells had both promoting and inhibitory effects on adipocyte differentiation/maturation. The effects depended on physical cell-cell interactions and soluble factors, respectively. The purpose of this study is to characterize the factors secreted from mast cells that suppress adipocyte differentiation/maturation. Culture supernatants of bone marrow-derived mast cells (BMMC) were ultrafiltered, or heat-treated, or enzyme-treated. The effect of each culture supernatant on adipocyte differentiation/maturation was evaluated using in vitro differentiation system of the mouse fibroblast line 3T3-L1 by measuring mRNA expression of Adiponectin, GLUT4, and aP2. As a result, >100 kDa fraction showed an inhibitory effect, while <50 and 50-100 kDa fractions did not show a remarkable effect. In addition, heat treatment at 65℃ for 30 min reduced the inhibitory effect but benzonase treatment did not affect it. Collectivity, it was suggested that the mast cell-derived soluble factor, which shows an inhibitory effect on adipocyte differentiation/maturation, is a heat-sensitive >100 kDa molecule other than polynucleotide.

mast cell, adipocyte, maturation

講演番号：3D04-03
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:30～ ミーティングルーム D

ピロール化タンパク質による抗 DNA 自己抗体産生機構に関する研究

Mechanism underlying anti-DNA autoantibody production mediated by pyrrolated protein in apoE-deficient mice

○林 世映[1]、近澤 未歩[1]、板倉 正典[1]、佐々木 栄太[1]、松田 知成[2]、内田 浩二[1]（[1]東大院農生科、[2]京大 RCEQM）
○SeiYoung LIM[1], Miho Chikazawa[1], Masanori Itakura[1], Eita Sasaki[1], Tomonari Matsuda[2], Koji Uchida[1] ([1]Univ. of Tokyo, [2]Kyoto Univ.)

生理的および病態生理的条件下において、過酸化脂質由来の代謝物によりタンパク質が修飾されそれにより免疫応答が引き起こされることが知られている。当研究室の先行研究により、リジン残基の修飾により形成されるエピトープ構造としてピロール構造が同定され、これが自己免疫疾患のバイオマーカーである抗 DNA 抗体に認識されることが明らかとなった(Miyashita et al., *Sci. Rep,* 2014)。また、動脈硬化モデルである apolipoprotein E (apoE)欠損マウスにおいて、ピロール化タンパク質の増加、および多重交差性抗 DNA 抗体反応の上昇が認められた(Hirose et al., *JBC,* 2019)。しかしピロール化タンパク質による抗体の産生機構及び生体におけるその意義については未だ不明な点が多い。そこで本研究では、apoE 欠損マウスにおけるピロール化タンパク質による多重交差性抗 DNA IgM の産生機構および機能解明を目的として検討を行った。
ELISA による血中抗体価測定の結果、野生型マウスと比較して、apoE 欠損マウスにおいてピロール化タンパク質と DNA に対する IgM 抗体価の経時的上昇が認められた。フローサイトメトリーによる解析の結果、apoE 欠損マウスにおいて、IgM を産生する B-1 細胞数の増加が確認された。さらにビオチン標識したピロール化タンパク質を用いて、ピロールに特異性を示す BCR を持つ B-1 細胞を単離し培養した結果、DNA に交差性を持つ抗体を産生することが確認された。現在、apoE 欠損マウスから作製された多重交差性モノクローナル抗体の機能解明および抗体のレパトア解析を試みている。

N^{ε}-pyrrole-L-lysine (pyrK), was recently identified as a modified structure of lysine residue with potential immunoreactivity and with DNA-like physicochemical properties. The high abundance of pyrrolated protein, as well as multi-specific autoantibody toward both DNA and pyrrolated proteins were observed in apolipoprotein E -deficient ($apoE^{-/-}$) mice, known as an atherosclerosis murine model. However, it is still unclear whether and how pyrrolated protein mediates autoantibody production. In the present study, the mechanism of pyrrolated protein-mediated anti-DNA IgM production was investigated using $apoE^{-/-}$ mice.
The autoreactive IgM responses against pyrrolated proteins and DNA were significantly increased in an age-dependent manner in $apoE^{-/-}$ mice compared to wild-type mice. Consistent with the previous observation, increased frequencies of B-1 cells, which are responsible for IgM production, were detected in $apoE^{-/-}$ mice. Furthermore, by using biotinylated pyrBSA, we identified that the cells expressing pyr-reactive BCR were capable of producing IgM responsive to DNA. In addition, we are going to discuss the role of multi-specific anti-DNA IgM using monoclonal antibodies established from $apoE^{-/-}$ mice. Antibody repertoire analysis with pyr-reactive B-1 cell clones will be also discussed in the presentation.

anti-DNA autoantibody, lysine N-pyrrolation, apoE-deficient mice

講演番号：3D04-04
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:30～ ミーティングルーム D

腸管内 GABA の生理的意義とその機構の解析

Physiological effects of intestinal GABA and its mechanism

○池上 美音[1]、近藤 祐衣[1]、福本 凛太郎[1]、原田 岳[2]、何 方[2]、宮澤 賢司[2]、藤 佑志郎[1]、松藤 寛[1]、中西 祐輔[1]、高橋 恭子[1] ([1]日本大学生物資源、[2]タカナシ乳業株式会社商品研究所)
○Mion IKEGAMI[1], Yui KONDO[1], Rintaro FUKUMOTO[1], Gaku HARATA[2], Fang HE[2], Kenji MIYAZAWA[2], Yushiro FUJI[1], Hiroshi MATSUFUJI[1], Yusuke NAKANISHI[1], Kyoko TAKAHASHI[1] ([1]Nihon Univ., [2]Takanashi Milk Products Co.,Ltd. Technical Research)

γ-アミノ酪酸(GABA）は、哺乳類における主要な抑制性神経伝達物質であり、多彩な生理作用を示すことが知られている。これまでに腸内細菌叢への介入によって腸管GABA濃度が変化することを報告した。本研究では、腸管GABAが宿主の生理作用に及ぼす影響、及び腸管上皮を介したGABAシグナル伝達の可能性について明らかにすることを目的とした。マウスに*Bifidobacterium bifidum* TMC 3115 （TMC3115）を経口投与し、投与期間後に高架式十字迷路を用いた行動試験、経時的に採取した糞便中のUPLC-MS/MSによるGABA濃度測定、糞便・盲腸内容物を用いた16S rRNA遺伝子配列の次世代シーケンスによる菌叢解析を行った。TMC3115投与によって腸管GABA濃度の有意な上昇、腸内細菌叢の変化が確認され、十字迷路試験でオープンアームへの侵入回数が上昇した。一方、ヒト腸管上皮細胞株Caco-2および HCT116を用いてGABAレセプター（GABA r）各サブユニットの発現量をリアルタイムPCRにより、GABA刺激によるMAPKのリン酸化をウェスタンブロッティングにより解析した。その結果、これらの腸管上皮細胞株にGABA r が発現し、GABA刺激によりErkの活性化が誘導されることが示された。また、細胞株により発現するGABA r のタイプ、MAPKの活性化パターンが異なることが示唆された。

γ-Aminobutyric acid (GABA), a major inhibitory neurotransmitter in mammals, is known to show various physiological effects. We have previously reported that intervention in gut microbiota affects intestinal GABA concentration in mice. *Bifidobacterium bifidum* TMC 3115 (TMC3115) was orally administered to mice in this study, and measurement of GABA concentrations in feces, analysis of gut microbiota composition by 16S rRNA sequences using feces and cecal contents, and behavioral test using elevated plus maze were conducted. Administration of TMC3115 elevated intestinal GABA concentration accompanied by some change in gut microbiota composition and increased entries to open arms in the plus maze test. Next, we analyzed the expression levels of GABA receptor (GABA r) subunits by real-time PCR and MAPK activation after stimulation with GABA by western blotting in human intestinal epithelial cell lines Caco-2 and HCT116. The results showed that GABA r subunits were expressed in these cell lines and Erk was activated upon GABA stimulation. We also found out types of the GABA r expressed and MAPK activation patterns differed between the two cell lines.

gamma-aminobutyric acid, intestinal tract

講演番号：3D04-05
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:30～ ミーティングルーム D

緑茶カテキン EGCG は 67-kDa ラミニン受容体を介してマクロファージの極性を調節する

EGCG regulates macrophage polarization through 67-kDa laminin receptor

○小原井 春香、冨岡 玲乃、西岡 成汰、村田 京介、福富 拓哉、山田 脩平、牧尾 彰子、藤村 由紀、立花 宏文 (九大院農院・生機科)
○ Haruka KOBARAI, Reno TOMIOKA, Seita NISHIOKA, Kyosuke MURATA, Takuya FUKUTOMI, Shuhei YAMADA, Akiko MAKIO, Yoshinori FUJIMURA, Hirofumi TACHIBANA (Kyushu Univ.)

【目的】マクロファージは炎症を促進する M1 型と炎症を抑制する M2 型の 2 種類に大別され、組織微小環境に応じた可逆的な極性変化が炎症応答に重要な役割を担っている。一方、緑茶の主要なカテキンである(－)-Epigallocatechin-3-*O*-gallate (EGCG) は抗炎症作用、脂質代謝調節作用、抗がん作用など多彩な生体調節作用を有する。また、EGCG の細胞膜受容体である 67-kDa ラミニン受容体(67LR)は、EGCG のさまざまな生体調節作用に関与していることが明らかにされている。そこで本研究では、EGCG がマクロファージの極性に与える影響ならびに 67LR の関与を明らかにすることを目的とした。
【方法および結果】EGCG を経口投与したマウスから腹腔マクロファージを採取し、マクロファージ極性マーカー遺伝子発現を評価した。その結果、EGCG の経口投与により、M2 マーカー遺伝子の発現量が増加した。 続いて、マクロファージを含む骨髄性細胞特異的に 67LR 遺伝子をノックアウトした 67lR-KO マウスより腹腔マクロファージを採取し、EGCG 処理後のマクロファージ極性マーカー遺伝子発現を評価したところ、EGCG による M2 マクロファージマーカー遺伝子発現の上昇が 67LR-KO によって消失した。
【結論】EGCG は 67LR を介してマクロファージの極性を炎症抑制型である M2 型へ分極させることが示された。

Macrophages can be functionally polarized into pro-inflammatory M1 phenotype and anti-inflammatory M2 phenotype in response to microenvironmental cues. The major polyphenol in green tea, (-)-Epigallocatechin-3-*O*-gallate (EGCG), has a variety of biological and pharmacological properties including cancer-preventive, and anti-inflammatory activities. The 67-kDa laminin receptor (67LR) has been identified as a cell surface receptor for EGCG that mediates biological activities of EGCG. In this study, we aimed to elucidate the effect of EGCG on macrophage polarization and assess the involvement of 67LR. Here, we showed that the expression of M2 makers in macrophages from mice were up-regulated by EGCG administration. Additionally, we found that EGCG treatment upregulated M2 maker expression in isolated macrophages. This activity of EGCG was canceled in macrophages derived from myeloid cell-specific 67LR knockout mice. Overall, these findings implicate EGCG polarizes macrophages toward anti-inflammatory M2 phenotype through 67LR.

EGCG, 67LR, macrophage

講演番号：3D04-06
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:30～ ミーティングルーム D

クルクミンと腸内細菌および短鎖脂肪酸の共刺激がパイエル板細胞応答を修飾する
Co-stimulation of curcumin, commensal bacteria and short chain fatty acids modifies response of Peyer's patch cells

○柴崎 涼太[1]、古川 凱斗[1]、津田 真人[1]、高野 智弘[2]、王 イバイ[2]、戸塚 護[3]、八村 敏志[2]、細野 朗[1] ([1]日本大学、[2]東大院農生科・食の安全研究セ農、[3]日獣応生)
○Ryota Shibasaki[1], Kaito Furukawa[1], Masato Tsuda[1], Tomohiro Takano[2], Ibai Ou[2], Mamoru Totsuka[3], Satoshi Hachimura[2], Akira Hosono[1] ([1]Nihon Univ., [2]Res Cent Food Safety, Univ.Tokyo, [3]N.V.L.Univ)

腸内細菌や短鎖脂肪酸のような腸内細菌代謝産物に加え、機能性食品成分もまた IgA 産生誘導などの腸管免疫応答に寄与すると考えられる。本研究では、高脂肪食条件下で糞便中の IgA 量増加作用をもつクルクミンを用いて、マウス由来の腸内細菌である *Bacteroides acidifaciens* type A43 加熱死菌体(BA)、短鎖脂肪酸のプロピオン酸との共刺激により、複数の腸内環境構成因子が IgA 産生機構へ与える協調的な作用とその機序の解明を目的とした。BALB/c マウスからパイエル板（PP）細胞を採取し、クルクミン(0, 2.5, 10 μM)、プロピオン酸(0, 1, 5, 10 mM)、BA(0, 10 μg/ml)刺激下で培養後、IgA 産生量や抗体産生に関連する遺伝子発現および B 細胞、$CD4^+$細胞へのアポトーシスへの影響を解析した。三者は、プロピオン酸 1 mM 以下の濃度、クルクミン 2.5 μM 条件において IgA 産生を協調的に増加させる傾向がみられ、アポトーシスに影響しなかった。しかし、プロピオン酸、クルクミン共に高濃度条件では B 細胞、$CD4^+$細胞ともにアポトーシスが強く誘導され、IgA 産生量も低下した。これらの結果により、至適濃度条件では BA、プロピオン酸、クルクミンが PP 細胞で協調的に IgA 産生を増強することが示唆された。

Not only gut microbiota and its metabolites, short-chain fatty acids (SCFAs), but also functional food ingredients will affect intestinal immune response, such as IgA induction. We tried to reveal the mechanisms of IgA induction with multiple intestinal environmental factors co-stimulations, curcumin (0, 2.5, 10 μM), a kinds of polyphenol which increase fecal IgA in high fat diet, mouse intestinal bacteria, heat-killed *Bacteroides acidifaciens* type A43 (BA) (0, 10 mg/ml), and propionic acid (SCFA) (0, 1, 5, 10 mM). We co-cultured BALB/c mice's Peyer's patch (PP) cells of BALB/c mice with these factors and analyzed the amount of IgA, IgA production related mRNA transcripts, and the effects on B cell and $CD4^+$ cell apoptosis. Our study shows that these factors at 2.5 μM curcumin and propionic acid under 1 mM do not affect B cell and $CD4^+$ cell's apoptotic cell death and possibly increase IgA. However, at a higher concentration, curcumin and propionic acid decrease IgA because of its B cell and $CD4^+$ cells apoptotic effects. Here we show that under optimum concentration, BA, propionic acid and curcumin cooperatively increase IgA production in PP.

commensal bacteria, short chain fatty acids, food immunology

講演番号：3D04-07
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:30～ ミーティングルーム D

皮膚アンチエイジング効果をもつポリフェノールの探索とその機能性

Identification and functional evaluation of polyphenols with anti-aging effects on skin

○森山 さやか、戸高 涼花、亀田 菜月、片倉 喜範 (九州大シス生)
○Sayaka MORIYAMA, Suzuka TODAKA, Natsuki KAMEDA, Yoshinori KATAKURA (Kyushu Univ.)

長寿遺伝子 SIRT1 は、ヒトの様々な組織でアンチエイジング効果を示すとされている。本研究では、皮膚での SIRT1 を活性化するポリフェノールの探索を行い、それらの機能性を明らかにすることを目的とした。

本実験では、表皮細胞モデルとしてヒト表皮ケラチノサイト由来の HaCaT 細胞を用いた。サンプルとして、23 種類のポリフェノールを使用した。スクリーニングを行った結果、8 種類のポリフェノールが SIRT1 プロモーターを、また、そのうちの 5 種類が内因性 SIRT1 発現レベルを増強することが明らかとなった（直接効果)。次に、Caco-2 細胞へポリフェノールを添加し、その上清を HaCaT 細胞へと添加した結果、8 種類が HaCaT における SIRT1 プロモーター活性を増強することが明らかとなった（間接効果)。以上の結果から、直接的（化粧品効果）あるいは間接的（サプリメント効果）に、ポリフェノールが、皮膚での SIRT1 発現を増強することが明らかとなった。今後、これらの SIRT1 増強成分の肌への効果やメカニズムを検証していく予定である。

The longevity gene SIRT1 has been shown to have anti-aging effects in various human tissues. In this study, we explored the polyphenols that activate SIRT1 in the skin and aimed to clarify their functionality.

In this experiment, HaCaT cells derived from human epidermal keratinocytes were used as an epidermal cell model. Twenty-three polyphenols were used as samples. Screening revealed that eight polyphenols enhanced the SIRT1 promoter and five of them enhanced the endogenous SIRT1 expression level (direct effect). Next, polyphenols were added to Caco-2 cells and the supernatant was added to HaCaT cells, and eight polyphenols were found to enhance SIRT1 promoter activity in HaCaT (indirect effect). These results indicate that polyphenols can enhance SIRT1 expression in the skin directly (cosmetic effect) or indirectly (supplement effect). We plan to examine the effects and mechanisms of these SIRT1-enhancing components on the skin in the future.

SIRT1, polyphenol, anti skin aging

発表責任者：片倉喜範（katakura@grt.kyushu-u.ac.jp）

講演番号：3D04-08
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:30～ ミーティングルーム D

食薬・油糧植物由来成分の皮膚老化改善効果

anti-skin aging effect of Morrocan plants derived extracts

○小櫃 実由[1]、中村 水玖[1]、Meriem Ledrhem[2]、Hafida Bouamama[2]、Gadhi Chemseddoha[2]、片倉 喜範[1] ([1]九州大シス生、[2]UNIVERSITE CADI AYYAD)
○Miyu Obitsu[1], Miku Nakamura[1], Ledrhem Meriem[2], Bouamama Hafida[2], Chemseddoha Gadhi[2], Yoshinori Katakura[1] ([1]Kyusyu Univ, [2]Cadi Ayyad Univ)

これまでに我々は、モロッコ原産の植物から水蒸気蒸留法により抽出した Essential oil が、ヒト表皮角化細胞 HaCaT 細胞において、長寿遺伝子 SIRT1 の発現量を増加させることを明らかにしている。そこで本研究では、表皮細胞における SIRT1 の機能性に着目し、Essential oil による SIRT1 増強を通じたミトコンドリア機能増強と細胞老化抑制の可能性について検証することを目的とした。まず、HaCaT 細胞における内在性 SIRT1 発現を増強する Essential oil を 7 種選定した。この 7 種の Essential oil は全て、HaCaT 細胞におけるミトコンドリアを活性化することを明らかにした。次に紫外線（UVB）照射を行った HaCaT 細胞を用いて検証を行った結果、Essential oil は UVB 照射に伴う細胞老化誘導を抑制し、また UVB 照射に伴うミトコンドリア機能の抑制を回復することが明らかとなった。以上の結果から、食薬・油糧植物由来の Essential oil 7 種は、HaCaT 細胞における長寿遺伝子活性化を通じて、UVB 照射に伴う細胞機能低下を抑制しうることを明らかにすることができた。

We have previously shown that Essential oil, extracted from a plant native to Morocco by steam distillation, increased the expression of the longevity gene SIRT1 in human epidermal keratinocytes, HaCaT cells. In this study, we focused on the functionality of SIRT1 in epidermal cells and aimed to evaluate the possibility of enhancing mitochondrial function and inhibiting cellular senescence through enhancement of SIRT1 by Essential oil. First, we selected seven essential oils that enhance endogenous SIRT1 expression in HaCaT cells. We found that all seven Essential Oils activated mitochondria in HaCaT cells. Next, we examined the results using HaCaT cells irradiated with ultraviolet light (UVB) and found that Essential oils inhibited the induction of cellular senescence and restored the UVB-induced suppression of mitochondrial function in HaCaT cells. These results indicate that seven Essential oils derived from food and oilseed plants can suppress UVB irradiation-induced loss of cellular function through activation of longevity genes in HaCaT cells.

Morrocan plants, Sirt1, anti-skin aging

発表責任者：片倉　喜範（Katakura@grt.kyushu-u.ac.jp）

講演番号：3D04-09
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:30～ ミーティングルーム D

フェルラ酸およびフェルラ酸-4'-*O*-グルクロニドのアミロイドβ神経細胞毒性に対する緩和効果

Both ferulic acid and ferulic acid-4'-*O*-glucuronide have the potential to prevent amyloid-ß-induced neurotoxicity

○外山 華恵[1]、原 崇[2]、三亀 啓吾[2]、城 斗志夫[2]、中村 澄子[3]、池内 健[4]、大坪 研一[3]([1]新潟大院自然科学、[2]新潟大農、[3]新潟薬大応用生命、[4]新潟大脳研)
○Hanae TOYAMA[1], Takashi HARA[2], Keigo MIKAME[2], Toshio JOH[2], Sumiko NAKAMURA[3], Takeshi IKEUCHI[4], Ken'ichi OHTSUBO[3] ([1]Gad. Sch. Sci. & Technol., Niigata Univ., [2]Fac. Agric., Niigata Univ., [3]Appl. Life Sci., Niigata Univ. Pharm. Appl. Life Sci., [4]Brain Res. Inst., Niigata Univ.)

フェルラ酸（FA）は in vitro で抗酸化性を示し，抗アルツハイマー病活性が期待されている。その一方で，FA は生体内で速やかにフェルラ酸-4-*O*-グルクロニド（FA4G）などの抱合体となり，ラジカル消去活性の減弱など，生理活性の消失が懸念されてきた。FA は DPPH ラジカル消去活性を示し，ヒト神経芽腫 SK-N-SH 細胞のアミロイドβ（Aβ）誘導性細胞死を抑制することが確認された。一方，FA4G は DPPH ラジカル消去活性をほとんど示さないが，FA と同様に SK-N-SH 細胞の Aβ誘導性細胞死を抑制した。FA と FA4G の両者共に，Aβによる細胞内 ROS レベル亢進と tau リン酸化亢進を抑制し，NRF2 の核移行を促し，抗酸化酵素 HO-1 の発現を増大させた。NRF2 siRNA により NRF2 をノックダウンすると，Aß 誘導性細胞死ならびに tau リン酸化亢進に対する FA および FA4G の抑制効果が顕著に減弱した。LC/MC 解析の結果，FA 処理の場合と同様に，FA4G 処理した SK-N-SH 細胞内に FA の存在が確認された。FA は，体内で抱合反応を受けて FA4G となっても，細胞内へ移行して FA として働き，NRF2 経路を介してアルツハイマー病予防に役立つ可能性が伺える。

本研究は，生研機構イノベーション創出強化研究推進事業「超高齢化社会対応と輸出促進のための認知症・糖尿病複合予防効果のある米加工食品の開発」の一部として実施した。

Ferulic acid (FA) acts as an antioxidant *in vitro* and is expected to have the potential for preventing Alzheimer's disease (AD). However, FA is known to undergo conjugation reactions *in vivo* and to become less effective in neutralizing free radicals. We observed that amyloid β (Aβ) decreased the cell viability with a concomitant increase in the intracellular ROS level in SK-N-SH cells, which was inhibited by pre-treatment with FA. Meanwhile, ferulic acid-4'-O-glucuronide (FA4G), one of the most abundant FA conjugates in plasma, showed almost no DPPH radical scavenging activity. Nevertheless, FA4G significantly prevented Aβ-induced cell death, intracellular ROS elevation and tau phosphorylation in SK-N-SH cells. Moreover, FA4G, as well as FA, upregulated antioxidant defense pathway, as evidenced by increased NRF2 nuclear translocation with a concomitant increase in HO-1 expression. siRNA knockdown of NRF2 significantly attenuated these protective effects of both FA and FA4G against AD. LC/MC analysis revealed that FA existed within both FA-treated and FA4G-treated SK-N-SH cells.

Ferulic acid-4'-*O*-glucuronide, Amyloid ß, NRF2

発表責任者：原崇（harata@agr.niigata-u.ac.jp）

講演番号：3D04-10
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:30～ ミーティングルーム D

黒米糠摂取による老齢マウス脳組織における tau リン酸化抑制とインシュリンシグナル増強

Oral intake of black rice bran attenuates tau phosphorylation while concomitantly enhancing insulin signaling in the brains of aged normal mice

○大畠 悠実[1]、外山 華恵[1]、原 崇[2]、池内 健[3]、中村 澄子[4]、城 斗志夫[2]、大坪 研一[4]([1]新潟大院自然科学、[2]新潟大農、[3]新潟大脳研、[4]新潟薬大応用生命)
○Yumi OHATA[1], Hanae TOYAMA[1], Takashi HARA[2], Takeshi IKEUCHI[3], Sumiko NAKAMURA[4], Toshio JOH[2], Ken'ichi OHTSUBO[4] ([1]Gad. Sch. Sci. & Technol., Niigata Univ., [2]Fac. Agric., Niigata Univ., [3]Brain Res. Inst., Niigata Univ., [4]Appl. Life Sci., Niigata Univ. Pharm. Appl. Life Sci.)

アントシアニンは，認知機能改善効果が期待されている。我々の研究グループは，アントシアニンを豊富に含む黒米のアルツハイマー病予防効果について検討してきた。アルツハイマー病は老人斑と神経原線維変化を病理学的特徴とし，神経細胞が脱落し，脳組織が委縮する。アルツハイマー病発症には，インシュリン抵抗性や酸化ストレスの関与も疑われている。野生型の老齢マウス（C57BL/6, ♂、30～35 週齢）に黒米糠(おくのむらさき，5%および 15%混餌投与)を 11～12 ヵ月間自由摂取させたところ，脳組織における tau のリン酸化が有意に抑制され，PI3K/AKT シグナル伝達経路の活性化と GSK3β の不活性化が確認された。神経原線維変化は過剰リン酸化 tau の凝集体であることから，この結果は黒米糠がアルツハイマー病予防に役立つ可能性を示す。また，黒米糠投与群マウス脳組織ではインスリンレセプターおよび IRS-1 のチロシンリン酸化が亢進し，インスリンシグナルの増強が確認された。さらに，脳組織における酸化ストレス防御機構として働く抗酸化酵素（NQO1，HO-1）のレベルも黒米糠摂取により増大していた。これらの結果より，黒米糠はアルツハイマー病予防に役立つことが期待され、その機序としてインスリンシグナル増強と酸化ストレス緩和が推察される。
本研究は，生研機構イノベーション創出強化研究推進事業「超高齢化社会対応と輸出促進のための認知症・糖尿病複合予防効果のある米加工食品の開発」の一部として実施した。

Black rice containing anthocyanin is expected to prevent and treat neurodegenerative diseases including Alzheimer's disease (AD). In this study, black rice bran (BRB) was orally administered to aged normal mice (C57BL/6, ♂, 30 to 35-weeks old) for consecutive 11 to 12 months. Mice fed BRB diets (5 and 15%) showed decreased level of phosphorylated tau (p-tau) in the brain tissues compared with control mice, in parallel with activated PI3K/AKT pathway and increased level of p-GSK3β (Ser9), an inactive form of GSK3β. These results indicate that BRB intake holds promise for preventing AD, since neurofibrillary tangles, one of the pathological hallmarks of AD, are mainly composed of aggregates of hyperphosphorylated tau protein. BRB intake also enhanced the brain levels of phosphorylated insulin receptor and IRS-1 (Tyr608), indicating enhanced insulin signaling. Furthermore, mice fed BRB showed increased levels of antioxidant enzymes including NQO1 and HO-1 in the brain tissues.
This research was supported by grants from the Project of the NARO Bio-oriented Technology Research Advancement Institution (Research program on development of innovative technology).

black rice bran, tau phosphorylation, insulin signaling pathway

発表責任者：原崇（harata@agr.niigata-u.ac.jp）

講演番号：3D04-11
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:30～ ミーティングルーム D

アガロオリゴ糖は *sir-2.1* を介して *Caenorhabditis elegans* の寿命を延伸する

Oligosaccharides from agar extends the lifespan of *Caenorhabditis elegans* via *sir-2.1*

○出坂 夏美[1]、西川 仁美[1]、水島 かつら[2]、髙木 智久[2]、内藤 裕二[2]、東村 泰希[1,2]([1]石川県大・生資環、[2]京府医院・医)
○Natsumi DESAKA[1], Hitomi NISHIKAWA[1], Katsura MIZUSHIMA[2], Tomohisa TAKAGI[2], Yuji NAITO[2], Yasuki HIGASHIMURA[1,2] ([1]Ishikawa Pref. Univ., [2]Kyoto Pref. Univ.)

寒天の主成分であるアガロースは、D-ガラクトースと 3,6-L-アンハイドロガラクトースがα1-3 結合で連結した構造を有する。このα1-3 結合は容易に酸加水分解され、2 糖から 8 糖までのアガロオリゴ糖（AGO）が生成される。AGO は抗酸化作用および抗炎症作用が報告されている。酸化ストレスや慢性的な炎症は生理的老化プロセスに関与することから、AGO は老化抑制に効果的と推測される。よって本研究では、線虫 *Caenorhabditis elegans*（*C. elegans*）をモデル生物に用いて、AGO の寿命延伸効果の検証および分子機序の解析を行った。

C. elegans は Bristol 株 N2 を野生体とし、成虫期から AGO を 0%（対照群）または 1%、5%（AGO 群）含む培地で飼育することにより AGO を摂取させた。AGO 群は、対照群と比較して高い生存率を示し、平均寿命を有意に延伸した。また、対照群よりも常に高い運動性を示し、老化に伴い蓄積するリポフスチンは有意に抑制した。一方で、産卵数および体面積は差を示さないことから、寿命延伸が食事制限に起因しないことが示唆された。マイクロアレイによる網羅的な遺伝子発現解析の結果、AGO 群において小胞体ストレス応答に関与する遺伝子群である *abu-/pqn-*遺伝子の発現上昇が観察された。これら遺伝子は *sir-2.1* によって負に制御されている。定量的リアルタイム PCR により、AGO 投与に伴う *sir-2.1* の発現減少および *abu-/pqn-*遺伝子の発現上昇が確認された。また、*sir-2.1* 欠損変異体では寿命延伸効果が減弱したことから、AGO による寿命延伸には、*sir-2.1* が関与することが示唆された。さらに、熱ストレス耐性を評価した結果、野生体では AGO 投与に伴う生存率の有意な上昇が観察された。一方で、*sir-2.1* 変異体では AGO 投与に伴う生存率の上昇は消失した。以上の結果から、アガロオリゴ糖は *sir-2.1* を介した小胞体ストレス応答の活性化によって、*C. elegans* の寿命を延伸することが示唆された。

Agarose, the main component of agar, is hydrolyzed easily to yield AGO. Previous reports showed that AGO exhibits antioxidant and anti-inflammatory functions, suggesting that AGO may also be effective in preventing ageing. So, the aim of this study is to evaluate the effect of AGO on lifespan extension and to elucidate the mechanism of AGO-mediated longevity in *C. elegans*. As a result, AGO significantly extended the lifespan of *C. elegans* by the activation of the unfolded protein response via *sir-2.1*.

Caenorhabditis elegans, longevity, oligosaccharide

講演番号：3D04-12
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:30～ ミーティングルーム D

ジャバラ果皮由来α-グルコシダーゼ阻害活性物質とその作用機構

α-Glucosidase inhibitiors from *Ctrus jabara* and their mode of action

○楠本 恵理、奥野 祥治（和歌山高専）
○Eri KUSUMOTO, Yoshiharu OKUNO (NIT, Wakayama College)

2019 年に行われた国連糖尿病連合(IDF)の調査によると、世界の糖尿病人口は 4 億 6300 万人にのぼり、成人の 11 人に 1 人が糖尿病に罹患している状況にある。糖尿病による高血糖状態は網膜症や神経障害などの合併症を引き起こすため、糖尿病患者にとって高血糖状態の緩和が重要な課題である。この課題を解決する手段の一つとして、二糖類分解酵素であるα−グルコシダーゼを阻害することが注目されている。α−グルコシダーゼを阻害することで単糖の吸収を抑制し、急激な血糖値の上昇を抑えることができるため、合併症の進行を防ぐのに有効的である。近年、植物や食品に含まれる阻害物質の研究が盛んに行われており、我々の研究室でも複数の農産物から阻害物質を見出している。

ジャバラ(*Citrus jabara*)は和歌山県北山村原産のミカン科ミカン属の香酸柑橘類であり、我々はこれまでに、アポトーシス誘導活性および抗肥満活性を明らかにしている。本研究では、ジャバラ果皮のメタノール抽出物がα−グルコシダーゼ阻害活性を示したため、ジャバラ果皮に含まれるα−グルコシダーゼ阻害活性物質の探索とその阻害機構について検討した。

阻害試験を指標として抽出物の分画を繰り返すことで、阻害物質の一つとして β-sitosterol (**1**)を単離した。化合物 **1** は 50 μM で 90%の阻害活性を示し、IC_{50} 値は 16 μM であった。一方、ジャバラ果皮の主成分である narirutin (**2**)活性を示さなかった。現在、ジャバラ果皮に含まれるその他の阻害成分についても検討を進めている。

Citrus jabara, a member of the family Rutaceae, is native to Kitayama village in Wakayama prefecture. We reported the apoptosis inducing activity and anti-obesity activity of this palnt extract and active compounds. However there has not been reported on the inhibitory compounds of α-glucosidase activity. In this study, we investigated the isolation and identification of the α-glucosidase inhibitor from *C. jabara*.

MeoH extract of *C. jabara* peel showed α-glucosidase inhibitory activity. To isolate active compounds, this extract was re-extracted by organic solvent and fractioned by SiO_2 chromatography using α-glucosidase inhibition assay as a guide, repeatedly. β-Sitosterol (**1**) was isolated and identified as inhibitory compound. Compound **1** inhibited 90% of α-glucosidase activity at a concentration of 50 μM and IC_{50} value was 16 μM. However narirutin, a main component of *C. jabara*, did not show activity. Currently, we are considering other active compounds and mode of action.

Citrus jabara, α-Glucosidase inhibitor, β-Sitosterol

講演番号：3D04-13
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:30～ ミーティングルーム D

C2C12 筋芽細胞に対するサクラケムシ糞茶の筋管細胞への分化促進効果
Sakurakemushi (*Phalera flavescens*) fecal tea promote C2C12 myoblast differentitation into myotube.

○高橋 有志[1,2]、吉田 泉[2]、藤田 和弘[2]、五十嵐 友二[2]、井内 良仁[1] ([1]山口大、[2]日本食品分析センター)
○Yushi TAKAHASHI[1,2], Izumi YOSHIDA[2], Kazuhiro FUJITA[2], Tomoji IGARASHI[2], Yoshihito IUCHI[1] ([1]Yamaguchi Univ., [2]JFRL)

昆虫の糞は古くから漢方で虫糞茶として飲用されており，味も風味も良く，整腸作用などの機能性があると言われている。我々は 昆虫食のなかでも桜の葉を食するため美味とされているモンクロシャチホコ（*Phalera flavescens*）の幼虫（サクラケムシ）の糞をお茶として利用できると考え，その筋肉増加作用について検討を行った。糞茶（PT）をオーバーコンフルエント状態にした C2C12 細胞に添加し，添加 2 日後の細胞から RNA を抽出しリアルタイム PCR を用いて筋管細胞への分化と代謝に関連する遺伝子の発現量を調べた。また，添加 3 日後の細胞について，ミオシンに対して免疫染色を行い，筋管細胞の数及び太さを調べた。PT を添加することにより筋細胞分化の制御因子である MyoD 及びミオゲニンの遺伝子発現量が増加した。免疫染色によって筋管細胞の太さを測定したところ，PT（0.2 mg/mL）の添加で約 40%太くなることを確認した。数についても増加傾向であった。また *Pgc1α*，*Tfam* 及び *Sdha* が増加したことから，PT はミトコンドリアを活性化させることによっても筋管細胞を太くしていると考えられた。以上の結果からサクラケムシの糞茶には筋肉増加作用と代謝活性化作用があることが示唆された。

Insect feces have long been drunk as insect feces tea in Chinese medicine, and are said to have functionality such as intestinal regulation. We considered that the feces of Monkuroshachihoko (*Phalera flavescens*) larvae (Sakurakemushi), which are delicious among insect foods because they eat cherry leaves, can be used as tea, and investigated their muscle-building effect. *Phalera flavescens* larvae feces tea (PT) was added to over confluent C2C12 cells, RNA was extracted from the cells 2 days after the addition, and the expression level of genes related to differentiation and metabolism into myotube cells was examined using real-time PCR. In addition, the cells were immunostained against myosin 3 days after the addition, and the number and thickness of myotube cells were examined. PT increased the gene expression levels of MyoD and myogenin, which are muscle regulatory factors. When the thickness of myotube cells was measured by immunostaining, it was confirmed that PT (0.2 mg / mL) increased the thickness by about 40%. The number of myotube cells was also on the rise. In addition, since *Pgc1α*, *Tfam* and *Sdha* increased, it was considered that PT also thickened myotube cells by activating mitochondria. These results suggested that the feces tea of Sakurakemushi has a muscle-building effect and a metabolism-activating effect.

C2C12, myoblast differentitation, fecal tea

発表責任者：高橋有志（takahashiyu@jfrl.or.jp）

講演番号：3D04-14
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:30～ ミーティングルーム D

糖質を用いた非アルコール性脂肪肝の *in vitro* モデル系の構築および解析

Construction of *in vitro* NAFLD model by saccharides

○太田 晴佳[1]、波津 優花[2]、本松 由衣[1]、薩 秀夫[1] ([1]前橋工大工、[2]前橋工大院工)
○Haruka OTA[1], Yuka HAZU[2], Yui MOTOMATSU[1], Hideo SATSU[1] ([1]Maebashi Inst. Technol., [2]Grad. Sch. of Eng., Maebashi Inst. Technol.)

【目的】近年飲酒歴がないにもかかわらず、アルコール性脂肪肝に類似した症状である非アルコール性脂肪肝（NAFLD）の患者数が増加している。NAFLD は非アルコール性脂肪肝炎へと進行し、さらに肝硬変や肝細胞がんへと悪化するリスクが報告されていることから、NAFLD の段階で食品成分による予防が期待される。NAFLD を予防する食品成分の探索に用いる *in vitro* 評価系として、遊離脂肪酸添加による NAFLD モデル系が知られる。本研究では、従来の遊離脂肪酸に加えて、糖質による *in vitro* NAFLD モデル系の構築及びそれを用いた食品成分の探索・解析を進めることとした。
【方法・結果】ヒト肝モデル HepG2 細胞に単糖であるグルコース、フルクトース、ガラクトースをそれぞれ添加して培養した後、Oil Red O 染色を用いて脂肪滴蓄積を観察し、さらにイソプロパノールを加えて Oil Red O を溶出させその吸光度を測定した。その結果、フルクトース添加によって最も強く HepG2 細胞における脂肪滴蓄積が観察された。そこでフルクトースによる脂肪滴蓄積を抑制する食品成分をフィトケミカルを用いて探索した結果、メトキシフラボノイドの一種であるノビレチンがフルクトースによる脂肪滴蓄積を抑制した。

[Objectives] In recent years, the number of patients with non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), which is a symptom similar to alcoholic fatty liver disease, has been increasing. NAFLD has been reported to progress to non-alcoholic steatohepatitis, further cirrhosis and hepatocellular carcinoma, and the prevention against NAFLD by food components is expected. As an *in vitro* model to search for food components which could prevent NAFLD, free fatty acid-induced NAFLD model has been developed. In this study, we attempted to develop another *in vitro* model using saccharides and searched for food components that are expected to prevent NAFLD.
[Methods and Results] Human hepatic HepG2 cells were incubated with glucose, fructose, or galactose for 24 hours. The intracellular lipids were stained with 60% Oil red O solution. Stained lipid droplets were also extracted for quantification by measuring its absorbance. As a result, fructose most induced lipid accumulation in HepG2 cells. Further we searched for food components which suppressed fructose-induced lipid accumulation and we found nobiletin, one of methoxyflavonoids, significantly suppressed lipid accumulation.

NAFLD, fructose, flavonoid

発表責任者：薩秀夫（satsu@maebashi-it.ac.jp）

講演番号：3D04-15
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:30～ ミーティングルーム D

アカメガシワ由来ポリフェノール、ベルゲニンの SIRT1/PGC-1α経路を介したミトコンドリア新生促進作用の解明

Stimulation of mitochondrial biogenesis by bergenin, a polyphenol abundant in *Mallotus Japonicus*, via SIRT1/PGC-1α signal pathway

○永良 祐樹[1]、赤川 貢[1]、内藤 健太郎[2] ([1]大阪府大院・生命環境、[2](株)ディーエイチシー)
○Yuki NAGARA[1], Mitsugu AKAGAWA[1], Kentaro NAITO[2] ([1]Osaka Prefec. Univ., [2]DHC)

ミトコンドリアは細胞における ATP 合成の 80%以上を担う重要なオルガネラであり、生体内では肝臓や骨格筋に多く存在している。老化や肥満によって惹起されるミトコンドリア量の低下や機能障害は、老化関連疾患や生活習慣病の発症と進展に密接に関与していることが明らかにされつつある。このような背景から、ミトコンドリア新生の促進がこれらの疾患の予防及び改善につながる可能性が示唆されている。本研究では食品による健康の維持増進を目的とし、ミトコンドリア新生促進作用を有する食品由来化合物の探索を行った。47 種類の食品由来化合物をヒト由来 HepG2 肝細胞に 24 時間処理し、ミトコンドリア新生促進作用を有する化合物の探索を行ったところ、アカメガシワなどの薬用植物に含まれるポリフェノールであるベルゲニンがミトコンドリア新生を促進させることを見出した。HepG2 細胞に 1–2 μM のベルゲニンを 24 時間処理したところ、MitoTracker 染色量とミトコンドリア DNA 量、電子伝達系複合体構成タンパク質発現量の増加が認められた。さらに、ベルゲニン処理によって peroxisome proliferator-activated receptor-γ-coactivator 1α (PGC-1α) の核内移行促進と標的遺伝子発現の活性化、NAD^+-dependent protein deacetylase sirtuin 1 (SIRT1) 発現量の増加が認められた。これらの結果から、ベルゲニンによるミトコンドリア新生の促進は SIRT1/PGC-1α 経路の活性化によることが示唆された。

A growing body of evidence shows that defects in mitochondrial function, dynamics, and biogenesis have been closely linked to a variety of age-related and metabolic disorders. Thus, stimulation of mitochondrial biogenesis has been considered as a potential approach to preserving the mitochondrial function and improving these disorders. The aim of this study was to find a novel food-derived enhancer of mitochondrial biogenesis. We performed a screening for 47 food-derived compounds that stimulate mitochondrial biogenesis in human HepG2 hepatocytes. We found that bergenin, a polyphenol in many medicinal plants such as *Mallotus japonicus*, significantly stimulates mitochondrial biogenesis. The exposure of HepG2 cells to 1−2 μM bergenin for 24 h resulted in increased levels of Mitotracker staining, mitochondrial DNA content, and protein complexes in the electron transport chain. Moreover, we observed that bergenin treatment facilitates nuclear translocation of the peroxisome proliferator-activated receptor-γ-coactivator 1α (PGC-1α) and its target gene expression, and up-regulates the NAD^+-dependent protein deacetylase sirtuin 1 (SIRT1). Our results suggest that bergenin-inducible mitochondrial biogenesis can be attributed to activation of the SIRT1/PGC-1α signaling pathway.

mitochodrial biogenesis, SIRT1, bergenin

発表責任者：赤川　貢（akagawa@biochem.osakafu-u.ac.jp）

講演番号：3D07-01
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:30～ ミーティングルーム D

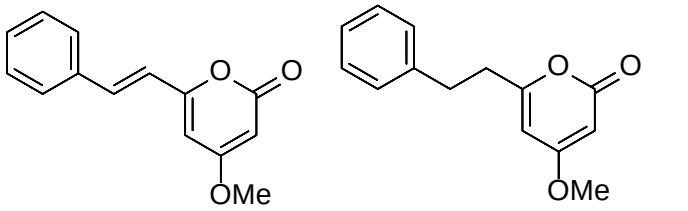
月桃由来 DK 及び DDK 高純度原料の製造法とその生物活性

Process for the production of high-purity DK and DDK powder from shell ginger and biological activities

○山野 亜紀[1]、戸井田 佳子[2]、中村 太郎[2]、夏目 敬行[3]、渡辺 章夫[4]、米澤 貴之[4]、照屋 俊明[3]、禹 済泰[2] ([1]琉球大学教育学部、[2]中部大学応用生物学部、[3]琉球大学大学院理工学研究科、[4]中部大学生物機能開発研究所)

○Aki Yamano[1], Yoshiko Toida[2], Taro Nakamura[2], Noriyuki Natsume[3], Akio Watanabe[4], Takayuki Yonezawa[4], Toshiaki Teruya[3], Jetae Woo[2] ([1]Faculty of Education, University of the Ryukyus, [2]Department of Biological Chemistry, Chubu University, [3]Graduate School of Science, University of the Ryukyus, [4]Research Institute for Biological Functions, Chubu University)

月桃（*Alpinia zerumbet*）は、沖縄に自生しているショウガ科の植物で、古くから防風林の他、虫よけ剤、抗菌剤、加工食品などに使われてきた。花や葉には DK（5,6-dehydrokawain）や DDK（Dihydro-5,6-dehydrokawain)が含まれており、メラニン形成阻害、糖化による AGEs 形成阻害、抗酸化、抗肥満効果など、様々な生理活性を示すことが報告されている。しかし花や葉の加工食品を食すことで摂取できる DK、DDK は、有効量に届かないことが多い。



DK (5,6-dehydrokawain)　DDK (Dihydro-5,6-dehydrokawain)

我々は月桃の花や葉から高純度の DK､DDK を含む粉末を得る方法を研究し､簡便な方法を開発した。月桃の花を乾燥後、含水エタノールで抽出し、抽出液を濃縮して得られた抽出物をアルカリ水溶液で処理する事で、DK、DDK を 90%以上含む粉末を得た。また、得られた粉末を用いて、マウスに対する急性毒性、慢性毒性試験を行った。最後に、培養肝細胞を用いて、月桃エキスとその成分である DK,DDK の生理活性を評価した。その結果、月桃エキス、DK、DDK の添加により、尿酸の産生の上昇が抑制された。

Shell ginger (*Alpinia zerumbet*) is a plant of the family *Zingiberaceae* that grows naturally in Okinawa, and has been used for windbreaks, as well as in insect repellents, antibacterial agents, processed foods, etc. The flowers and leaves of this plant contain DK (5,6-dehydrokawain) and DDK (Dihydro-5,6-dehydrokawain), which have various effects such as the inhibition of melanin formation and inhibition of advanced glycation end products (AGEs), in addition to antioxidant and anti-obesity effects. However, the DK and DDK obtained by eating processed foods that contain shell ginger flowers or leaves often do not contain enough of these compounds for effective intake.

Thus, we developed a simple method of manufacturing powders containing high-purity DK and DDK from shell ginger flowers and leaves. After drying the shell ginger flowers, they were extracted with aqueous ethanol, then the extract was concentrated and treated with an alkaline aqueous solution to obtain a powder containing 90% or more DK and DDK. In addition, we have performed acute and chronic toxicity tests with this powder on mice. Furthermore, we found the crude extracts of shell ginger, DK and DDK significantly suppressed the uric acid production in hyperuricemic model hepatocytes.

Kavalactone, Shell ginger, Biological activities

講演番号：3D07-02
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:30～ ミーティングルーム D

オーバーミキシングがケーキ生地の物性と構造に及ぼす影響

Effects of overmixing cake batter on its physical and structural properties

○平野 晴菜[1]、増子 朝貞[2]、今泉 鉄平[1]、勝野 那嘉子[1]、西津 貴久[1] ([1]岐阜大学、[2]三菱ケミカルフーズ株式会社)
○Haruna Hirano[1], Tomosada Masuko[2], Teppei Imaizumi[1], Nakako Katsuno[1], Takahisa Nishizu[1] ([1]Gifu Univ, [2]MITSUBISHI-CHEMICAL FOOD CORPORATION)

【目的】工場生産品のケーキ生地は，比重管理がされているが，同比重でもミキシング時間が長くなるとケーキ食感は低下する。当研究室ではヘルムホルツ共鳴法によるミキシング中の比重モニタリングの検討を行っているが，オーバーミキシング中にヘルムホルツ共鳴周波数が減少することを見出した。この減少はグルテン形成と気泡構造の変化によると考え，これを検証することを目的とした。

【方法】バッターは薄力粉・卵・起泡剤・砂糖・水・膨張剤を用いて調製した。小麦粉，卵，起泡剤のいずれかを除いた８種類のバッターについて，ミキシング中の共鳴周波数と比重を測定した。またバッターの遊離 SH 基量測定と X 線 μCT 測定，CLSM 観察を行った。

【結果・考察】ミキシング開始後，比重は減少した。一方，共鳴周波数は増加したが，最大値に達してからは徐々に減少した。小麦粉のみを除いた場合，共鳴周波数は最大値に到達後減少しなかった。オーバーミキシングの間に遊離 SH 基量は減少し，タンパク質分布が変化する様子が CLSM で観察された。またこの期間に大きいサイズの気泡数の割合は増加する傾向であった。ミキシングに伴うグルテン形成による気泡界面の物性変化と気泡の合一が，共鳴周波数の減少に影響を与える可能性があると考える。

For manufactured cake, its quality depends on a time of mixing cake-batter in the production process. A specific gravity of cake batter is decreasing with mixing it. An appropriate time for mixing is determined by its specific gravity.
We have developed a novel acoustical method using the Helmholtz resonance phenomenon to evaluate physical properties of foam. In this study, we examined whether a resonant frequency is effective to evaluate the cake batter's properties during the mixing process.

sponge cake, the Helmholtz resonance, mixing

発表責任者：西津貴久（nishizu@gifu-u.ac.jp）

講演番号：3D07-03
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:30～ ミーティングルーム D

乳化剤がパンケーキ中の小麦澱粉糊化および老化特性に及ぼす影響

Effects of emulsifiers on gelatinization and retrogradation of starch in pancake

○永田 幹太朗[1]、勝野 那嘉子[2]、中川 奈菜[3]、今泉 鉄平[2]、西津 貴久[2]([1]岐阜大院・自然研、[2]岐阜大・応生、[3]株式会社日清製粉グループ本社)
○Kantaro NAGATA[1], Nakako KATSUNO[2], Nana NAKAGAWA[3], Teppei IMAIZUMI[2], Takahisa NISHIZU[2] ([1]Graduate School of Natl. Sci. Tech, Gifu Univ., [2]Gifu Univ., [3]Nisshin Seifun Group Inc.)

市販のパンケーキやパンケーキのミックス粉には，生地の分散性や起泡性を向上させるために，乳化剤が添加されることがある。乳化剤には，糊化澱粉の老化を抑制する効果があると報告されていることから，パンケーキの老化を抑制する可能性がある。これまでの研究より、小麦澱粉ゲルを用いた場合，乳化剤の老化抑制にはアミロース脂質複合体が関与し，その複合体形成に乳化剤の構造と脂肪酸鎖長が大きく影響することが明らかになった[1)]。本研究では，乳化剤中の脂肪酸の種類の違いが，パンケーキ中の小麦澱粉の糊化ならびに老化特性に及ぼす影響について検討した。

乳化剤試料として，パルミチン酸，ステアリン酸，オレイン酸，リノール酸の 4 種のモノグリセリンモノ脂肪酸エステルを使用した。パンケーキを作製後，5 ℃で 72 時間冷蔵し，粉末 X 線回折測定（XRD）に供した。また，小麦粉ミックス，乳化剤に牛乳，全卵液，水を加え，粘度測定（RVA）に供した。XRD の 2θ＝17 ° のピークからパンケーキ中糊化澱粉の老化度を評価したところ，小麦澱粉ゲルと同様に，乳化剤による老化抑制効果が確認された。また，RVA では乳化剤添加により粘度の低下が確認された。これより，パンケーキの系においても，乳化剤は澱粉の糊化特性および老化特性に影響すると考えられる。老化抑制効果および粘度に及ぼす影響については，不飽和脂肪酸（オレイン酸，リノール酸）からなる乳化剤で高く，飽和脂肪酸（ステアリン酸，パルミチン酸）からなる乳化剤で低かった。しかし，小麦澱粉ゲルによる知見とは一致しなかったことから，パンケーキでは牛乳や全卵液のような他の副原料と乳化剤との間の相互的な作用が，澱粉と乳化剤の複合体形成能に影響している可能性が考えられる。

In this study, we investigated the effects of different types of fatty acids in emulsifiers on the gelatinization and retrogradation properties of wheat starch in pancakes. The XRD and RVA results suggest that emulsifiers affect starch gelatinization and retrogradation properties of pancake. The emulsifier composed of unsaturated fatty acids affected the RVA viscosity of batter and suppressed starch-retrogradation as compared with the emulsifier composed of saturated fatty acids. The interaction between the emulsifier and some ingredients such as milk and egg might affect the ability of the starch and emulsifier to form a complex.

1）永田幹太朗ら，日本農芸化学会 2020 年度大会.

monoglycerin fatty acid ester, starch gelatinization, starch retrogradation

講演番号：3D07-04
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:30～ ミーティングルーム D

酵素添加が冷凍米飯の老化特性に及ぼす影響

Effect of enzyme addition on freeze-thaw deterioration of cooked rice

○國枝 美沙[1]、橋本 朋子[2]、勝野 那嘉子[3]、今泉 鉄平[3]、西津 貴久[3]([1]岐阜大院・自然研、[2]日本水産株式会社、[3]岐阜大・応生)
○Misa KUNIEDA[1], Tomoko HASHIMOTO[2], Nakako KATSUNO[3], Teppei IMAIZUMI[3], Takahisa NISHIZU[3] ([1]Graduate School of Natural Science and Technology, Gifu Univ., [2]Nippon Suisan Kaisha, Ltd., [3]Faculty of Applied Biological Sciences, Gifu Univ.)

米の消費形態は年々変化し，近年では特に冷凍品の需要が高まっている。市場が拡大する中，家庭での冷凍保存期間が長くなると外観や風味等を保ちにくいことが課題として挙げられる。以前より米粒内成分の相互作用と米加工品の品質との関係に関する報告例は多数あるが，冷凍保存中のタンパク質の変化が米飯品質に与える影響については不明な点が多い。そこで，炊飯加工時に酵素を作用させ，加工中のタンパク質の SH 基と SS 結合の変化と，冷凍保存下の老化特性の関係について検討した。

本研究では平成 30 年度青森県産まっしぐらを使用し，リパーゼ（Lip）およびグルコースオキシダーゼ（GO）を加水と同時に添加した。炊飯中に各酵素製剤の至適温度帯になった時に，遊離 SH 基含量が減少した。特に Lip は澱粉の糊化開始温度付近での活性が最も高かった。長期冷凍保存を再現した試料を XRD（Rigaku，SmartLab9kW）に供し，X 線回折図（Cu Kα 線）から老化度を決定したところ，酵素無添加区と比較して Lip の添加による老化度の減少傾向がみられた。これらの結果より，Lip は澱粉の糊化開始温度付近での活性が高いことから遊離 SH 基が SS 結合の形成に利用され，澱粉粒の過度な膨潤を防いで崩壊を抑制し，老化を遅延させたと推察した。GO は米飯の弾力を向上させることが過去に報告されているが，これは炊飯初期段階での活性が高いことから SS 結合の形成時期が早く，それに伴って吸水自体を抑制したことによるものだと推察した。

This study was performed to clarify the relationship between forming disulfide bonds (S-S bonds) in proteins by the addition of enzymes during cooking and the retrogradation characteristics of rice starch in the frozen storage process.

In this study, nonwaxy japonica rice, cv. Masshigura, was used. Lipase or glucose oxidase was added just before cooking. As the cooking temperature got closer to an optimal temperature for lipase activity, the free sulfhydryl group content got lower. The XRD measurement results showed that the addition of lipase lowered the starch retrogradation of frozen cooked rice. It is speculated that lipase promotes forming S-S bonds, which prevents the breakdown of starch granules. Glucose oxidase had a high activity in the early stage of cooking, and S-S bonds were formed earlier. Therefore, it was suggested that water absorption was inhibited, which hardened the cooked rice texture.

frozen cooked rice, retrogradation, disulfide bond

講演番号：3D07-05
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:30～ ミーティングルーム D

沈降静水圧測定による米粉パン生地物性の評価

Evaluation of the physical properties of rice flour batter by hydrostatic pressure measurement

○池田 紗南、今泉 鉄平、勝野 那嘉子、西津 貴久（岐阜大）
○Sana IKEDA, Teppei IMAIZUMI, Nakako KATSUNO, Takahisa NISHIZU (Gifu Univ.)

【目的】先行研究から，粥の添加により焼成前のバッターの粘弾性が変化し，焼成した米粉パンの物性が改善されることが明らかになった．しかし，焼成パンの物性改善メカニズムは不明であったため，粥の添加が粘弾性以外の生地特性に及ぼす影響を調べる必要があった．澱粉は水より比重が大きいため，米粉バッター中の澱粉粒は時間経過とともに沈降・堆積する．本研究では，このような澱粉粒の分散状態が焼成パンの品質に及ぼす影響を調べるため，米粉バッターの新規物性評価法として沈降静水圧法を提案し，米粉バッター中の澱粉粒の分散状態の評価を行った．
【方法】米粉のみ（0%），米粉 100 g のうち生米換算で 5%，7.5%，10%にそれぞれ等しい重量の米が含まれるよう 8 倍加水粥を添加した生地を作製した．総加水量は粥中の水も考慮して米粉重量に対して 90%となるよう調整した．生地の分散状態は沈降静水圧式スラリー評価装置（ジャパンホテルグッズサプライ株式会社，HYSTAP-T）を用いて評価を行った．生地を内径 27 mm の 100 mL メスシリンダーに入れ，圧力伝達管をメスシリンダーの底に触れるまで静かに突き刺し，1 時間経過後までの静水圧の変化を記録した．また，外乱の影響を低減するため，実験は防振マットの上で行った．
【結果および考察】90%の加水では粥を添加しなくとも静水圧はほとんど変化せず，分散状態を維持していた．粥の添加により静水圧は減少し，粥置換割合の増加に伴って静水圧曲線の傾きが大きくなったことから，米粉バッター全体がゲル様になったと予想される．粥置換割合の増加に伴い焼成パンの体積が増加することから，このような米粉バッターの性状の変化が気泡の維持につながったと予想される．

The addition of rice porridge changing the viscoelasticity of rice flour batter, and improving the physical properties of rice bread was revealed by previous research. However, the improvement mechanism of the physical properties of baked bread is unclear. In order to reveal the mechanism, the effect of the dispersion state of starch grain in rice flour batter on the quality of bread was investigated. The dispersion state was evaluated by hydrostatic pressure measurement as a new method for evaluating the physical properties of rice flour batter. The hydrostatic pressure hardly changed without the addition of rice porridge. The hydrostatic pressure was declined by the addition of rice porridge. The inclination of the hydrostatic pressure curve increased with the increase in the rice porridge substitution ratio.

Gluten-free rice bread, Rice flour slurry, Hydrostatic pressure

講演番号：3D07-06
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:30～ ミーティングルーム D

米粉バッターのホイッピング特性に関する現象論的解析

Phenomenological approach of the whipping behavior for rice flour-based batter

○石川 大太郎[1]、市川 千晶[2]、楊 嘉敏[2]、藤井 智幸[2] ([1]福島大食農、[2]東北大農)
○Daitaro ISHIKAWA[1], Chiaki ICHIKAWA[2], Jiamin YANG[2], Tomoyuki FUJII[2] ([1]Fukushima Univ., [2]Touhoku Univ.)

食品の食感を制御するためにホイッピングによって空気を含ませることが多い。ホイッピングによって生成する泡沫層の平均気泡径は、粘度、表面張力といった物性値と、撹拌速度といった操作条件の影響を受けると予想される。本研究では、米粉と豆乳からなるバッター試料について、米粉の粉体特性、溶液の液特性およびホイッピング操作が気泡生成に及ぼす影響を無次元数を用いて整理することを試みた。試料は、ひとめぼれ(平成 25 年宮城県産）を用い、異なる粉砕方法により 6 種類の米粉を調製した。各粉体の平均粒子径と密度を測定し、固体特性を反映した粒子基準のボンド数(Bo)を求めた。また米粉粉体層の吸水量 V_L[mL]の経時変化を測定することで吸水曲線を得、濡れ性パラメータとして粉体層内細孔直径 d_c と接触角 θ 、粒子直径 d_p を用いた $d_c\cos\theta/d_p$ を算出した。バッター試料は、0-40%のスクロースを溶解した豆乳、40-60%溶解した SDS 溶液をそれぞれ米粉に添加し、ハンドミキサーで撹拌・起泡させて調製した。調製した含泡生地に含まれる気泡群の直径は実体顕微鏡にて測定し平均気泡径を算出した。

起泡棒が気液界面を通過したときに生じる凹みによって気泡が生成すると考えると、起泡棒の太さと生成気泡の大きさとの比が、各種物性値、撹拌速度との間に相似の関係が成立する可能性がある。本研究では、ウェーバー数(We)、レイノルズ数(Re)、フルード数(Fr)に加え Bo と $d_c\cos\theta/d_p$ を用い、気泡径分布がほぼ一定になったみかけの平衡状態について平均気泡直径の実験式を得た。米粉の添加量に対して米粉の体積分率を考慮することによって、高い相関で 1 つの予測式で表現できることが示された。そして、We、Re に関する指数および Bo に関する指数は小さくなり、$d_c\cos\theta/d_p$ に関する指数は大きくなった。以上の結果から、固気液三相分散系のホイッピング挙動が無次元数によって予測可能であることが示された。

The aim of the present study was to evaluate the whipping properties of rice flour based-batter which forms three-phase dispersion containing different concentration of sucrose with soymilk or SDS solution. The prediction regression of dimensionless mean diameter (dbm/d) reflecting the whipping behavior was developed by the Weber number (We), Reynolds number (Re), Froude number (Fr) for two-phase foam, and Bond number (Bo) and dccosθ/dp calculated by the dynamic wettability test as parameters corresponding to solid properties. The dbm/d was expressed well by these parameters and volume fraction of rice flour in all prepared samples. Indices corresponded to We, Re and Bo became small and that of dccosθ/ dp became large according to increase of rice flour. Consequently, these results successfully demonstrated the potential to evaluate the whipping process by dimensionless parameters.

whipping behavior, dimensionless parameter, three-phase dispersion system

発表責任者：藤井智幸（atom@tohoku.ac.jp）

講演番号：3D07-07
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:30～ ミーティングルーム D

TDS による冷菓の食感特徴評価

Dynamic texture characterization of ice creams using TDS

○太田 美樹、石原 清香、後藤 佳代、栗田 真衣、中馬 誠、船見 孝博（三栄源エフ・エフ・アイ（株））
○Miki OTA, Sayaka ISHIHARA, Kayo GOTO, Mai KURITA, Makoto NAKAUMA, Takahiro FUNAMI (San-Ei Gen F.F.I., Inc.)

【目的】アイスクリーム類は、乳成分の量の多い順にアイスクリーム、アイスミルク、ラクトアイスの 3 種類に分類され、食感の傾向も異なる。本研究では、経時的な感覚変化を評価できる TDS（Temporal Dominance of Sensations）法により、アイスクリーム類の摂食過程におけるダイナミックな食感変化を可視化して分類ごとの特徴を調べること、及び安定剤を使用した試作品の評価を行うことを目的とし、市販及び試作のバニラアイスを評価した。
【方法】試料は、市販品（アイスクリーム 5 種、アイスミルク 2 種、ラクトアイス 4 種）、試作品（安定剤不使用または使用したラクトアイス 3 種）を用いた。12 名の被験者に、－18℃に調温したアイス 8 mL を提示し、TDS 法により評価させた。評価用語は食感に関する 8 用語（かたい、ふんわり、ねっちり、さくい、なめらか、シャリシャリ、もったり、すっきり）とした。
【結果】市販のアイスクリームでは「ねっちり」、「なめらか」の選択率が高く、ラクトアイスでは「さくい」、「ふんわり」、「シャリシャリ」の選択率が高い傾向がみられた。アイスミルクは、アイスクリームまたはラクトアイスに近い 2 種の TDS 曲線に分かれた。試作したアイスでは、安定剤の種類により選択される用語とその選択率が異なっており、安定剤の食感改良効果を視覚化できた。ラクトアイスをアイスクリーム様の食感に変えることができる安定剤もあり、TDS 法による食感評価が製剤開発に役立つ可能性が示唆された。

Dynamic texture properties of ice creams with different milk solid content were evaluated using TDS (Temporal Dominance of Sensations). Eleven commercially available products and 3 samples prepared in our laboratory (with or without stabilizers) were used. Twelve panelists evaluated in-mouth texture of each sample using 8 terms (hard, soft, sticky, easily cracked, smooth, icy, heavy, and light).
From the TDS curves of the commercial products, the texture of the samples with high milk solid content were characterized by ″sticky″ and ″smooth″, whereas those with low milk solid content by ″easily cracked″, ″soft″, and ″icy″ attributes. As for laboratory samples, the TDS curves revealed that the addition of the stabilizers had a positive influence on the texture of ice creams with low milk solid content. Results suggest that texture evaluation of using TDS could be useful tool for development of stabilizers for ice creams.

TDS, ice creams, texture

発表責任者：太田美樹（miki-ota@saneigenffi.co.jp）

講演番号：3D07-08
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:30～ ミーティングルーム D

LC-MS/MS による麻痺性貝毒分析

Analysis of Paralytic shellfish toxins by LC-MS/MS

○橘田 規[1]、佐野 勇気[1]、小林 まなみ[2]、高橋 洋武[1]、渡邉 淳[2]、照井 善光[1]([1]日本食品検査、[2]島津製作所)
○ Tadashi KITTA[1], Yuki SANO[1], Manami KOBAYASHI[2], Hirotake TAKAHASHI[1], Jun WATANABE[2], Yoshimitsu TERUI[1] ([1]Japan Food Inspection Corporation, [2]Shimadzu Corporation)

麻痺性貝毒は *Alexandrium tamarense*，*Gymnodinium catenatum* 等の渦鞭毛藻類が産生する自然毒である。主要な成分は，サキシトキシン(STX)，ネオサキシトキシン(neoSTX)，ゴニオトキシン(GTX1～6)，プロトゴニオトキシン(C1～4)，デカルバモイルサキシトキシン(dcSTX)，デカルバモイルゴニオトキシン(dcGTX1～4)である。我が国における麻痺性貝毒の公定法は，マウスの腹腔内に投与した毒量と死亡時間に一定の関係があることを利用した AOAC 法 (OMA 959.08) に準拠したマウス毒性試験である。麻痺性貝毒の規制対象物質である STX は,「化学兵器の禁止及び特定物質の規制に関する法律」に基づく特定物質に指定されているため，実質的に所持，使用等が禁止されている。そのため，STX 標準物質を用いないマウス毒性試験は，食品衛生法の規制値（4 MU/g 可食部）への適合性を判定することができる唯一の方法である。

一方，諸外国ではプレカラム酸化 LC-FL 法(OMA 2005.06)，ポストカラム酸化 LC-FL 法(OMA 2011.02)等が実用化され，国内でも二枚貝の生産管理においてスクリーニング法の使用が認められる等，世界中でマウスを用いない分析法の開発，導入が進んでいる。

本研究では，マウス毒性試験の代替として有効な分析法を開発することを目的として，コースロン研究所が開発した HILIC-MS/MS 法 [1),2)]の改良，STX の間接定量法の検討及びマウス毒性試験との相関性の検証を行った。

1) Boundy M. et al., *J. Chromatography A*, **1387**, 1-12 (2015).
2) Turner A. D. et al., *J. AOAC Int.*, **98**, 609-621 (2015).

Paralytic shellfish toxins are natural toxins produced by dinoflagellates such as *Alexandrium tamarense*, *Gymnodinium catenatum*, etc. STX, a controlled substance of paralytic shellfish toxins, is designated as a specific chemicals under the "Act on the Prohibition of Chemical Weapons and the Regulation of Specific Chemicals" and possession, use, etc. of STX are practically prohibited. Therefore, the mouse toxicity test is the only method that can determine conformity of the regulatory limit (4 MU/g edible portion) of the Food Sanitation Law.

In this study, we improved the Cawtron Institute's HILIC-MS/MS method[1),2)], which was newly developed to replace the pre and post column oxidation LC-FL methods (AOAC 2005.06, AOAC 2011.02), and investigated an indirect quantification method for STX, and verified its correlation with the mouse toxicity test.

LC-MS/MS, Paralytic shellfish toxins, PSP

発表責任者：橘田　規（t_kitta@jffic.or.jp）

講演番号：3D07-09
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:30～ ミーティングルーム D

ナスに含まれる新規食品機能性成分アセチルコリンの加熱調理による含有量変化

Changes in the content of acetylcholine, a new food functional component in eggplant during heattreatment

○王 文豪[1]、和具 なおみ[3]、宮武 宏治[2]、山口 翔平[1]、中村 浩蔵[3]([1]信州大院総合医理工、[2]農研機構野菜花き研究部門、[3]信州大農)
○Wenhao WANG[1], Naomi WAGU[3], Koji MIYATAKE[2], Shohei YAMAGUCHI[1], Kozo NAKAMURA[3] ([1]Graduate School of Med. Sci. Tech., Shinshu Univ., [2]Institute of Vegetable and Floriculture Science (NIVFS), National Agriculture and Food Research Organization (NARO), [3]Shinshu Univ.)

【目的】アセチルコリン（ACh）は脊椎動物の神経伝達物質として知られるほか、植物や菌類にも含まれており、自然界に普遍的に存在する化合物である。我々は、ナス（*Solanum melongena*）が他の作物の約 3000 倍の ACh を含むこと [(1)]、臨床試験で 2.3 mg/人・日の ACh を含むナス粉末の継続摂取が血圧や心理状態を改善することを明らかにし [(2)]、ナス由来 ACh が新規な食品機能性成分であることを実証した。本研究では、日本市販ナスの果実中 ACh 含有量、ナスの植物体と果実における ACh 分布、加熱調理後のナス果実中 ACh 含有量変化を調査した。
【方法】日本で市販されるナス 26 種類を ACh 含有量調査対象として選定した。ACh 分布調査では、ナス植物体および果実を部位別にサンプリングした。加熱調理方法として、電子レンジ調理、揚げ調理を検討した。各サンプルの凍結乾燥粉末を調製し、希塩酸で振盪抽出、抽出液を陽イオン交換樹脂で固相抽出し、LC-MS/MS 分析による標準添加法で定量した。定量値は内部標準回収率で補正した。
【結果】調査した日本市販ナス品種すべてに ACh を確認し、最高含有量は 11 ± 0.61 mg/100 g 生鮮重量（F.W.）（土佐鷹）、最低含有量は 0.11 ± 0.046 mg/100 g F.W.（竜馬）であった。ナス植物体中の ACh は果実に偏在しており、果実の成長に伴い含有量が増加した。果実中の ACh 分布は均一であった。加熱調理後のナス果実中 ACh 含有量は生鮮ナスに対し有意な高値が認められた。本研究により、ACh はナスの品種に関わらず含有されていることを確認した。さらにナス果実中の ACh は加熱により増加することが明らかとなり、ナスは ACh を関与成分とした機能性食品の優れた原料として優れた加工特性を有していると考えられる。本研究は農研機構生研支援センター「革新的技術開発・緊急展開事業（うち経営体強化プロジェクト)」の支援を受けて実施した。

We found that eggplant contained about 3000 times higher ACh than other crops [(1)], and daily ingestion of ACh derived from eggplant improved human blood pressure and psychological state [(2)]. In this study, we investigated the ACh content of eggplants sold in the Japanese market, the ACh distribution in plant body and fruit of eggplant, and the change in ACh content after heat treatment. All eggplant samples contained ACh. ACh was concentrated in the fruit with the growth, and the ACh in the fruit was uniformly distributed. The heat treatment of eggplant fruit increased the ACh content, suggesting ACh derived from eggplant was stable to heat cooking. These results indicate that the eggplant is suitable for use as a functional food material to take in ACh.

(1) Wang, W., et al., (2020) *Foods*, 9, 1029. (2) Nishimura, M., et al., (2019) *Nutrients*, 11, 2797.

eggplant, acetylcholine, heat treatment

発表責任者：中村浩蔵（knakamu@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：3D07-10
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:30～ ミーティングルーム D

間引きした真昆布の有効利用～昆布シートの作成の試み～

Effective use of thinned Konbu ~Trial to make Konbu sheet~

亀井 日向子、平田 健人、安齋 潤一郎、○清野 晃之（函館高専）
HINAKO KAMEI, KENTO HIRATA, JUNICHIRO ANSAI, ○TERUYUKI SEINO (Hakodate Kosen)

北海道南部の地域で養殖されている真昆布は出汁用の他に、その副産物である間引き昆布がある。2~3 月に採られた間引き昆布は早煮昆布として販売され、その甘みと柔らかさから、サラダや昆布巻の材料として一定の需要はあるが、形が悪く変色したものの一部は廃棄されているのが現状である。廃棄ゼロを目指して、地元水産会社では間引き昆布の特徴を生かした新たな商品として「焼きのり風昆布シート」の開発を進めているが、食感が硬く、風味も弱いため、改善策はないかと技術相談を受けた。そこで、昆布の細胞壁を酵素で分解処理することで、昆布の柔らかさや風味が改善されるのではないかと考え検討することとした。

粗粉砕した真昆布にセルラーゼ酵素（濃度 0.3、0.5、1.0 %）を加えて処理したものをすだれの上に流し，手漉きでシート状に成形し，乾燥することで焼きのり風昆布シートを作成した。

その結果、酵素処理した昆布でもシートにすることが可能とわかり、また、酵素濃度が高くなることでパリッとした食感を得ることができた。さらに、昆布の風味もより感じられたことから、問題解決に繋がったと言える。本講演では、現在進めている昆布シートの水分，脂肪分，灰分，粗タンパク質量などの評価結果や今後の展開について紹介する予定である。

Thinned Konbu, which is a by-product of Konbu, is in constant demand as a material for salads and Konbu rolls due to its sweetness and softness, but some of it is discolored due to its bad shape and is discarded. Therefore, we thought that the cell wall of Konbu could be decomposed with an enzyme and made into a sheet, which would lead to effective utilization.

A Konbu sheet made by adding cellulase enzyme (concentration 0.3, 0.5, 1.0%) to coarsely crushed Konbu was poured onto a bamboo blind, molded into a sheet by hand, and dried to create a roasted seaweed-style Konbu sheet.

As a result, it was found that even treated enzyme Konbu could be made in a sheet, and a crispy texture could be obtained by increasing the enzyme concentration. In addition, the flavor of Konbu was felt more, which can be said to have helped solve the problem. In this lecture, we plan to introduce the evaluation items such as water content, fat content, ash content, and crude protein content of Konbu sheets that are currently underway, and future developments.

Konbu, enzyme, Konbu sheet

発表責任者：清野晃之（tseino@hakodate-ct.ac.jp）

講演番号：3D07-11
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:30～ ミーティングルーム D

さつま砂糖漬けにおける発酵期間中の真菌叢と品質変化

Changes in fungal microbiota and food quality of *Satsuma satozuke* during fermentation

○福田 翼、小林 聡子、辰野 竜平、古下 学 (水大校・食品科学)
○Tsubasa FUKUDA, Satoko KOBAYASHI, Ryohei TATSUNO, Manabu FURUSHITA (National Fisheries Univ.)

さつま砂糖漬けは，江戸時代の料理集「鯛百珍料理秘密箱」（1785 年）に記載された薩摩地方の保存食である。「鯛百珍料理秘密箱」によれば、さつま砂糖漬けは、タイ魚肉を長期熟成した味噌である三年味噌への漬け込みと砂糖への漬け込みによって製造される。これまでの研究成果より，さつま砂糖漬けの味噌漬け工程は，細菌増殖を抑制し，風味を向上させる事が明らかとなった。また，製造に使用した味噌より *Zygosaccharomyces* 属が単離された。そこで，タイを利用したさつま砂糖漬け（以下，味噌漬けと表記）および味噌漬け工程を省いたさつま砂糖漬け（以下，未処理と表記）を作製し，保存期間中の微生物数および真菌叢変化について調査を行った。発酵期間中の細菌数は，味噌漬けの方が未処理よりも低かった。一方，発酵期間中の酵母数は，発酵 0 ヶ月目から発酵 1 ヶ月目までは未処理の方が高く，発酵 2 ヶ月目には同程度，発酵 3 ヶ月目には味噌漬けの方が高かった。未処理の真菌叢は，発酵 1 ヶ月目には *Rhodosporidium* 属と *Embellisia* 属が大半を占めていた。さらに，発酵時間の経過と共に *Rhodosporidium* 属が優占となった。一方，味噌漬けの真菌叢は，発酵 1 ヶ月目には *Rhodosporidium* 属が優占であった。しかし, 発酵時間の経過と共に *Zygosaccharomyces* 属が優占となった。本講演では，上記の研究成果と共に，風味に及ぼす影響についても紹介する。

Satsuma satozuke was a preserved food of red sea bream in *Satsuma* district (currently *Kagoshima* prefecture) in Japan at Edo period. *Satsuma satozuke* was produced by two-steps preserving in *miso* and sugar. Our previous study revealed that the effect of preserving in miso improved the quality of fish meat of red sea bream under *Satsuma satozuke* processing. This study investigated the microbial properties of fish meats with and without preserving in miso under *Satsuma satozuke* processing.

The bacterial counts of fish meat with preserving in miso were lower than without preserving in miso during storage. However, the yeast counts on fish meat with preserving in miso were higher than without preserving in miso from the 2 months storage onward. In case of the microbial properties of fish meat with preserving in miso, *Rhodosporidium* sp. occupied about 30% after 1 month fermentation, *Zygosaccharomyces* sp. occupied about 90% after 3 month fermentation. In case of fish meat without preserving in miso, *Rhodosporidium* sp. occupied about 30% and 40%after 1 month fermentation, *Rhodosporidium* sp. occupied about 85% after 3 month fermentation.

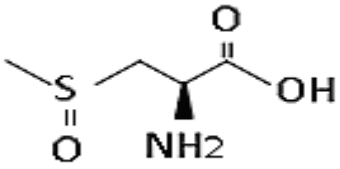
fermentation, traditional food, microbiota

講演番号：3D07-12
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:30～ ミーティングルーム D

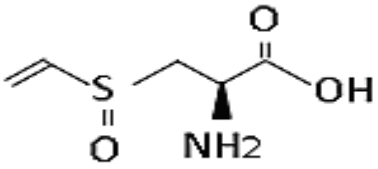
ニラの鮮度評価
Freshness evaluation of Chinese Chives

○安齋 潤一郎、清野 晃之（函館高専）
○Junichiro ANSAI, Teruyuki SEINO (Hakodate kosen.)

本研究室ではこれまで函館近郊のニラの産地である知内町との連携により，ニラを化学的な視点から研究し，その結果を町へフィードバックまたは消費者に情報提供することを進めている。その成果として，ニラ抽出物の抗肝臓がん効果について調べた結果，がん細胞を弱らせる効果があることを世界で初めて著者らは証明した。それに関与している成分が下図のメチインやアリインではないかと示唆している。



メチイン



アリイン

メチインとアリインはニラの葉肉細胞中に貯蔵され，また，維管束鞘細胞にはアリイナーゼという酵素が存在している。包丁などでニラを切ることで，両者が外に飛び出し，素早く反応することでニオイ成分に変化すると言われている。ニラの鮮度を評価する際には，見た目はもちろんのこと，ニオイの変化も重要な因子になると言える。本研究室ではこれまで，冷凍可能と言われているニラの鮮度評価について，メチインとアリインを定量分析することで，細胞壁のダメージ度，即ち，鮮度を間接的に評価できないかどうか検討した結果，傾向が得られることを明らかとしている．

この考え方を冷蔵保存でも適用できるかどうかを検討するために，本講演では見た目の評価やクロロフィル量，糖度の値に加え，ニオイ成分の元であるメチイン・アリイン量から鮮度評価をしていく試みについて紹介する. 実験では冷蔵保存温度以外に, 20℃や 30℃に設定した際の評価も行っている．

The purpose of this study is to evaluate not only the appearance of Chinese chives under each storage condition but also the internal state. For the freshness evaluation, the amount of methiin and alliin in the Chinese chive were measured by High performance liquid chromatography (HPLC), chlorophyl by absorbance, and sugar content by a sugar content meter. As a result, it was confirmed that the of temperature change influenced the inside and outside of Chinese chives.

Methiin, Alliin, HPLC

発表責任者：清野晃之（tseino@hakodate-ct.ac.jp）

講演番号：3D07-13
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:30～ ミーティングルーム D

シクロデキストリン包接によるオルトジヒドロキシイソフラボンの溶解性向上

Solubility enhancement of *ortho*-dihydroxyisoflavone by complexation with cyclodextrin

○上梶 友記子[1]、中田 大介[1]、平松 直人[2]、寺尾 啓二[1] ([1]シクロケムバイオ、[2]東洋発酵)
○Yukiko UEKAJI[1], Daisuke NAKATA[1], Naoto HIRAMATSU[2], Keiji TERAO[1] ([1]CycloChem Bio, [2]Toyo Hakko)

糖化は還元糖とタンパク質の非酵素的な反応であり、その結果生成される糖化最終産物 (AGEs) は老化や糖尿病合併症との関連が指摘されている。発酵大豆抽出物から精製されるオルトジヒドロキシイソフラボン (ODI) は抗糖化食品素材として近年注目されており、ODI の摂取が体内の糖化リスクを低減し、皮膚の老化を防ぐことが報告されている。また、環状オリゴ糖であるシクロデキストリン (CD) は、疎水性空洞内に種々の疎水性化合物を取り込む包接作用を有することが知られている。本研究では、CD との包接体形成が ODI の溶解性に与える影響について調査した。まず、水中に各 CD を添加した際の ODI の溶解度相図を作成したところ、α-CD ならびに β-CD では A_L 型の相図が得られた。一方、γ-CD は B_S 型の相図で示され、ODI の溶解度は 1 % γ-CD で最大であった。次に、各 CD を用いて総イソフラボン含有量が 5 % または 10 % の ODI-CD 包接体を作製し、生体吸収性の指標として有用な人工腸液 (FeSSIF) に対する ODI の溶解性を評価した。その結果、γ-CD では包接体形成によって ODI の溶解性が高まったのに対し、α-CD と β-CD は ODI の溶解性にほとんど影響を与えなかった。これらの結果より、ODI は γ-CD との包接体形成によって生体吸収性が向上する可能性が示唆された。

Glycation is the binding reaction of proteins with reducing sugars, through a non-enzymatic reaction to produce advanced glycation end-products (AGEs). *ortho*-Dihydroxyisoflavones (ODI) have received attention recently as anti-glycation substances. In previous studies, it has been reported that the intake of ODI reduces the risk of glycation in the body and prevents skin aging. Cyclodextrins (CD) are known to have the ability to incorporate various hydrophobic compounds into hydrophobic cavities. In this study, the effects of ODI by complexation with CD on the solubility enhancement were investigated. The solubility phase diagram of ODI with the addition of CD in water was determined. In the both α-CD and β-CD systems, A_L-type diagrams were obtained. On the other hand, the γ-CD system was shown B_S-type diagram and the aqueous solubility of ODI was maximum at 1% γ-CD concentration. Then, ODI-CD complexes with total isoflavones content of 5% or 10 % were prepared using CD, and the solubility of ODI in Fed State Simulated Intestinal Fluid (FeSSIF) which is useful as an indicator of bioavailability, was evaluated. The solubility of the ODIs in FeSSIF was enhanced by complexation with γ-CD. On the other hand, α-CD and β-CD didn't affect the solubility of ODI in FeSSIF. These results suggest that bioavailability of ODI is improved by complexation with γ-CD.

ortho-dihydroxyisoflavone, cyclodextrin, solubility

発表責任者：上梶 友記子（yukiko.uekaji@cyclochem.com）

講演番号：3E01-01
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:00～ ミーティングルーム E

乳酸菌 *Leuconostoc mesenteroides* NTM048 の摂取はマウスの乾癬症状を軽減する

Leuconostoc mesenteroides NTM048 attenuates the disease symptoms in a murine model of psoriasis

○小川 知紗[1]、井上 亮[2]、久 景子[3]、米島 靖記[3]、山本 祥也[1]、鈴木 卓弥[1]([1]広島大院・統合生命、[2]摂南大・農、[3]Noster 株式会社)
○Chisa OGAWA[1], Ryo INOUE[2], Keiko HISA[3], Yasunori YONEJIMA[3], Yoshinari YAMAMOTO[1], Takuya SUZUKI[1] ([1]Hiroshima Univ., [2]Setsunan Univ., [3]Noster,Inc.)

【背景・目的】乾癬は、慢性炎症を基盤とする皮膚疾患の１つであり、インターロイキン（IL）-17 の上昇に加えて、腸内細菌叢の変化も関わることが提案されている。乳酸菌 *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* NTM048 は、エンドウ豆から単離した乳酸菌であり、本菌株のマウスへの投与は腸管粘膜における IgA 産生を促進することが報告されている。また私たちの動物試験において、本菌株の産生する菌体外多糖の摂取が腸管バリアの修復を介して慢性腎不全の進行を抑制することも確認している。本研究では、乾癬のモデルマウスを用いて、本菌株摂取による乾癬の予防作用について検討した。
【方法】マウス（Balb/c、雌性、6 週齢）に NTM048 株を 21 日間投与した（0、1 x 10^{10}、1 x 10^{11} cfu/匹･日）。15 日目から背部皮膚にイミキモドクリームを塗布し、乾癬を誘導した（50 mg/匹･日）。乾癬誘導後、症状スコア（PASI スコア：紅斑、皮膚肥厚度、症状範囲の観察により算出）を毎日測定した。乾癬誘導後の 2 および 6 日後に背部皮膚組織を採取して、皮膚肥厚度と IL-17 等のサイトカイン産生量を測定した。さらに、次世代シーケンサーを用いた糞中の腸内細菌叢の解析、LC/MS/MS を用いた盲腸内容物と血液中の代謝物解析を実施し、本株摂取による変化を解析した。
【結果・考察】乾癬モデルマウスにおいて、NTM048 株の摂取は、PASI スコア、および皮膚肥厚度を低下させ、乾癬の症状を軽減した。また NTM048 株の摂取により、皮膚の IL-17 発現が抑制されており、乾癬軽減作用と関連付けられた。現在、腸内細菌叢、および代謝物との関連性について解析を進めている。

【Background・Aims】Pathogenesis of psoriasis, an inflammatory skin disease, is involved in the up-regulation of IL-17 and alteration of intestinal microflora. Here, we examined the ameliorative effects of *Leuconostoc mesenteroides* NTM048 in psoriatic mice.
【Methods】The NTM048 were orally administered to psoriatic mice. The disease symptoms and IL-17 expression were examined. Fecal microbiota and microbial metabolites in the cecum and plasma of mice were also analyzed.
【Result・Discussion】Supplemental NTM048 strain suppressed the disease symptoms and IL-17 expression in the skin of psoriatic mice. The fecal microbiota and some microbial metabolites in cecal contents and plasma are under analysis.

intestinal microbiota, lactic acid bacteria, psoriasis

講演番号：3E01-02
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:00～ ミーティングルーム E

クレソンに含まれるウレア化合物の摂取がマウス血中エイコサノイドに与える影響

Analysis of eicosanoids in plasma of mice fed ureas in watercress

○中屋 慎[1,2,3]、中上 拓海[3]、濱野 未宇[1]、藤原 永年[4]、庄條 愛子[5]、北村 進一[2]([1]大手前栄養学院専門学校、[2]大阪府立大学、[3]大手前大学、[4]帝塚山大学、[5]相愛大学)
○ Makoto Nakaya[1,2,3], Takumi Nakaue[3], Miu Hamano[1], Nagatoshi Fujiwara[4], Aiko Shojo[5], Shinichi Kitamura[2] ([1]Otemae College of Nutrition, [2]Osaka Prefecture University, [3]Otemae University, [4]Tezukayama University, [5]Soai University)

葉物野菜として知られるクレソン（オランダガラシ，*Nasturtium officinale*）は抗炎症効果などの種々の健康増進効果を示すことが知られている。我々はクレソンに含まれる微量物質 1,3-ジフェネチルウレア（PE-UR）がフェネチルイソチオシアネート（PE-ITC）と同様に可溶性エポキシドヒドロラーゼ（sEH）を阻害することを見出した。sEH はアラキドン酸から生成する CYP 経路のエイコサノイドに関与し炎症促進的に働くことから，クレソンに含まれる PE-UR は sEH を阻害することで抗炎症効果などの機能性を示すことが予想される。そこで，我々はウレアがクレソンの機能性成分のひとつであると仮説をたて，その機能性を動物実験により検証した。

C57BL/6 マウスにクレソン粉末，PE-ITC，PE-UR をそれぞれ 4 週間自由摂取させ，脂質代謝や血清エイコサノイドに与える影響を調べた。血清に含まれるエイコサノイドとその代謝物を LC-MS^2 法により網羅的に解析したところ，クレソン粉末や PE-ITC，PE-UR を摂取したマウスではいずれも sEH の基質であるエイコサトリエノイックアシッド類量が増加し，生成物であるジヒドロキシエイコサトリエノイックアシッド類量が低減する傾向にあった。さらに興味深いことに，アラキドン酸から生成し炎症促進的に働くシクロオキシゲナーゼ（COX）経路やリポキシゲナーゼ（LOX）経路のエイコサノイド量がクレソンや PE-UR を摂取した群で低減したのに対し，PE-ITC を摂取した群では低減しなかった。この結果は，PE-UR の抗炎症効果には CYP 経路の sEH に対する阻害だけでなく，COX 経路や LOX 経路が関与する抗炎症メカニズムが存在することを示唆する。

Watercress (*Nasturtium officinale*, family Brassicaceae) is a traditional food plant in Europe that has beneficial effects for human health and it is becoming popular in Japan as a healthy vegetable. To identify the main functional materials for health in watercress, we tested the effects of derivatives of glucosinolates using mice. We found that phenetylisothiocyanate (PE-ITC) and 1,3-diphenetylurea (PE-UR) in watercress have sEH inhibitory activity and anti-inflammatory effect in mice fed a high-fat and high-sugar diet. We also found eicosanoids derived from arachidonic acid were switched to anti-inflammatory effect through not only CYP pathway but also COX and LOX pathways in plasma from PE-UR fed mice. We suspect that these are two of the main functional materials contributing to the beneficial effects of watercress.

watercress, ureas, eicosanoids

発表責任者：中屋　慎（mnakaya@otemae.ac.jp）

講演番号：3E01-03
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:00～ ミーティングルーム E

レスベラトロールおよびその類縁化合物の抗アレルギー効果

Anti-allergic effect of resveratrol and its analogs

○村上 裕紀[1]、水﨑 愛[2]、西 甲介[2]、石田 萌子[2]、菅原 卓也[2] ([1]愛媛大・農、[2]愛媛大院・農)
○ YUKI MURAKAMI[1], AI MIZUSAKI[2], KOSUKE NISHI[2], MOMOKO ISHIDA[2], TAKUYA SUGAHARA[2] ([1]Fac.Agr.,Ehime Univ., [2]Grad.Sch.Agr.,Ehime Univ.)

近年、Ⅰ型アレルギーの罹患者は年々増加し、社会問題となっている。Ⅰ型アレルギーは生体内にアレルゲンが異物として取り込まれることによって生じる。しかし、抗アレルギー剤は眠気などの副作用が出るため、より安全で副作用のない抗アレルギー作用を持つ機能性食品への期待が高まっている。パッションフルーツは亜熱帯地域を原産とする果物で、主に菓子や飲料の原料として用いられる。本研究ではパッションフルーツの種子に含まれる生理活性物質であるレスベラトロールやピセアタンノール、及びそれらの二量体の抗アレルギー効果の検討を行った。まずヒト骨髄腫細胞株 U266 細胞に対する IgE 産生抑制効果を検討した。その結果、レスベラトロール二量体の Gunetin C およびピセアタンノール二量体の trans-Scirpusin B に強い IgE 産生抑制効果が認められた。しかしながら、IgE 遺伝子発現への影響を検討したところ、いずれの化合物も遺伝子発現には影響しないことが明らかになった。また、ラット好塩基球細胞株 RBL-2H3 細胞に対するヒスタミン内包顆粒の放出、すなわち脱顆粒に対する影響を検討したところ、いずれの化合物も脱顆粒抑制効果があることが確認できた。これらの結果から、レスベラトロール、ピセアタンノールおよびこれら類縁化合物には、IgE 産生抑制と脱顆粒抑制によるⅠ型アレルギー抑制効果があることが確認できた。

In recent years, the number of people suffering from type I allergy has been increasing year by year, which has become a social problem. Type I allergy is caused by the uptake of allergens as foreign substances in the body. However, since anti-allergic medicines cause side effects such as drowsiness, expectations are increasing for functional foods that are safer and have anti-allergic effects without side effects. Passion fruit is a fruit native to the subtropical region and it is mainly used as a raw material for confectionery and beverages. In this study, the anti-allergic effects of resveratrol and piceatannol, which are bioactive substances contained in passion fruit seeds, and their dimers are investigated. First, a comparative study of the IgE production suppressive effect was conducted. As a result, an intence IgE production suppressive effect was observed on Gunetin C, dimer of resveratrol and trans-Scirpusin B, dimer of piceatannol. Next, the effect of each compound on gene expression was evaluated. As a result, no significant effect was observed. In addition, these compounds also suppressed degranulation by rat basophilic cell line, RBL-2H3 cells. It is suggested that these compounds are effective on ant-allergy.

anti-allergic effects, Passion fruit, IgE production

講演番号：3E01-04
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:00～ ミーティングルーム E

Lactobacillus paracasei K71 の経口投与による IgA 産生促進と NK 活性増強効果

Enhancement of IgA production and natural killer cell activity by oral administration of *Lactobacillus paracasei* K71

○山本 佳奈[1]、吉澤 梓織[2]、畑 実里[2]、三原 敏敬[1]、杉本 淑惠[1]、内山 公子[1]、城 斗志夫[2]、原 崇[2] ([1]亀田製菓、[2]新潟大農)
○ Kana YAMAMOTO[1], Shiori YOSHIZAWA[2], Misato HATA[2], Toshihiro MIHARA[1], Yoshie SUGIMOTO[1], Kimiko UCHIYAMA[1], Toshio JOH[2], Takashi HARA[2] ([1]Kameda Seika Co., Ltd., [2]Fac. Agric., Niigata Univ.)

酒粕由来の乳酸菌 *Lactobacillus paracasei* K71（LpK71）は、Th1 応答誘導活性を示すことが確認されている[1)]。本研究では、加熱殺菌した LpK71 の摂取がマウスの細胞傷害活性と IgA 産生を増強するか検討した。C57BL/6 マウス（6 週齢、♀）に LpK71 を 2 週間摂取（0.5 mg/mouse/day）させると、糞中の総 IgA レベルが亢進し、粘膜系免疫機構に属する腸間膜リンパ節や全身系免疫機構に属する顎下リンパ節において IgA^+CD19^+細胞の存在比率が上昇していた。さらに、LpK71 投与群のパイエル板および腸間膜リンパ節において $CD11^+CD45R^+$細胞の APRIL 発現レベルが増加する傾向が確認された。よって、LpK71 投与による IgA 産生増強は、粘膜免疫組織における $CD11^+CD45R^+$細胞の APRIL 産生を介して誘導されることが示唆された。また、LpK71 投与群は対照群と比較し、NK 細胞による YAC-1 細胞に対する細胞傷害活性が増強し、IL-2+IL-12 誘導性 IFN-γ 産生も増加していた。これらの結果は、加熱殺菌した LpK71 が NK 細胞の働きを増強する可能性を示す。現在、LpK71 が粘膜免疫組織に働きかけ、NK 細胞の活性化と IgA 産生につながる仕組みについて調査中である。

Lactobacillus paracasei K71 (LpK71) isolated from *sakekasu* (sake lees) was found to serve as an inducer of Th1 responses.[1)] This study investigated the effects of heat-killed LpK71 on IgA production and cytotoxic activity, employing C57BL/6 mice (6 weeks old, ♀). Heat-killed LpK71 intake (0.5 mg/day) for 2 weeks increased fecal IgA level with a concomitant increase in the population of IgA^+CD19^+ B cells in mesenteric lymph nodes and submandibular lymph nodes. Additionally, Peyer's patches and mesenteric lymph nodes from mice administered heat-killed LpK71 showed enhanced APRIL expression in $CD11^+CD45R^+$ dendritic cells. These results raise the possibility that LpK71 may promote APRIL expression in plasmacytoid dendritic cells existing in gut-associated lymphoid tissues, which in turn induce B cells producing IgA. Meanwhile, LpK71 intake enhanced the cytotoxic activity of spleen cells against YAC-1 target cells. Spleen cells from mice administered LpK71 showed increased IFN-γ production in response to IL-2+IL-12 compared to the control group. Therefore, LpK71 is likely to augment the function of NK cells.

1）Food Sci. Technol. Res., 19 (1), 127–132, 2013.

Lactobacillus paracasei K71, IgA production, NK cell activity

講演番号：3E01-05
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:00～ ミーティングルーム E

活性化マクロファージにおけるケルセチン抱合代謝物の機能性

Biological activities of quercetin glucuronide regio-isomers in LPS or RANKL challenged RAW264.7 cells

○西川 美宇、加田 ゆり子、木全 未来、松村 美咲、榊 利之、生城 真一（富山県大工）
○Miyu NISHIKAWA, Yuriko KADA, Mirai KIMATA, Misaki MATSUMURA, Toshiyuki SAKAKI, Shinichi IKUSHIRO (Toyama Pref. Univ.)

食品機能性成分であるポリフェノールは UDP-グルクロン酸転移酵素 (UGT)、硫酸転移酵素(SULT)やカテコール-σ-メチル基転移酵素 (COMT) などの第 II 相異物代謝酵素によって位置異性体を含む多様な抱合代謝物に変換され、生体内では大部分が抱合代謝物として存在する。そのためこれらの化合物の生理作用メカニズムを解明するためには、化合物の代謝解析に基づく機能性評価が必要である。本研究では炎症細胞における抱合代謝物の機能性とその代謝運命を検証するために、活性化マクロファージにおけるケルセチン(QUE)およびイソラムネチン (IR, 3`-σ-メトキシケルセチン) 由来グルクロン酸抱合体の生理活性評価と代謝解析を行った。

UGT 発現酵母を用いて 4 種の QUE-グルクロン酸抱合体 (QUE-3G, 7G, 3'G, 4'G) および 3 種の IR-グルクロン酸抱合体 (IR-3G, 7G, 4'G) 位置異性体を調製した。LPS による炎症誘導条件下では QUE および IR アグリコンだけでなく、グルクロン酸抱合体も炎症性サイトカインである IL-6 の発現抑制を示した。また RANKL による破骨細胞分化誘導試験においても、グルクロン酸抱合体による破骨細胞分化抑制作用が認められた。LPS および RANKL による細胞刺激条件下ではグルクロン酸抱合体の脱抱合が亢進しており、これらの生理作用は脱抱合により生じたアグリコンによるものと推察された。異物代謝によって生じたグルクロン酸抱合体はアグリコンよりも細胞毒性が低く、これまで単なる不活化代謝物と考えられていた抱合代謝物が安全域の広い輸送形態および局所的な活性体供与体として機能している可能性が示された。

Xenobiotic compounds including dietary polyphenols are preferably converted into various types of metabolites by xenobiotic metabolizing enzymes such as UDP-glucuronosyltransferases (UGTs) and sulfotransferases (SULTs). We evaluated the biological activities of glucuronide regio-isomers of quercetin (QUE) and isorhamnetin (IR) in LPS or RANKL challenged RAW264.7 macrophage cells. Not only QUE and IR aglycones but also these glucuronides exerted the anti-inflammatory activity in LPS challenged RAW264.7 cells. Glucuronide conjugates also inhibited the osteoclast differentiation in RANKL challenged RAW264.7 cells. Metabolic analysis revealed that deconjugation of glucuronide into aglycone was increased in LPS or RANKL-challenged cells, suggesting that the conjugated metabolites have a role in delivery system of active form in human body.

xenobiotic metabolism, glucuronide, macrophage

講演番号：3E01-06
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:00～ ミーティングルーム E

味噌の摂取は免疫ロバストネスを高める

Ingestion of miso strengthens immune robustness

○小竹 久仁彦[1,2]、熊澤 利彦[1,2]、安達 貴弘[2]（[1]イチビキ株式会社、[2]東京医科歯科大・難研・免疫）
○ Kunihiko KOTAKE[1,2], Toshihiko KUMAZAWA[1,2], Takahiro ADACHI[2] ([1]Ichibiki CO., [2]Department of Immunology, Medical Research Institute, Tokyo Medical and Dental University)

わが国では味噌の消費の長い歴史があり、人の健康に対して有用な効果があることが明らかになっている。但し、これらの背後にあるメカニズムは完全には解明されていない。味噌の免疫細胞への影響を明らかにするため、マウスに 5%味噌入り餌あるいは対照餌を食べさせ、味噌の摂取による脾臓細胞の組成の変化を調べた。味噌の摂取により、マウスの脾臓の全 B 細胞の割合と全 T 細胞の割合は変わらなかった。しかし、B 細胞の活性化マーカーである CD69 陽性の B 細胞、活性化された B 細胞が分化する胚中心 B 細胞、そして免疫寛容に重要な制御性 T 細胞の割合が、味噌の摂取により増加した。また、自己免疫疾患の抑制に必要な抗 DNA-IgM 抗体価が、味噌の摂取により増加した。また Ca^{2+} バイオセンサーを全身に発現するマウスを用いた生体イメージングにおいて、小腸上皮に味噌抽出液を添加したところ、乳酸菌などのプロバイオティクス素材と同様に Ca^{2+} シグナルを誘発することが分かった。このように味噌は免疫賦活と免疫寛容の両方向に働くことで、免疫系を成熟させ、ロバストネスを高めていることが明らかになった。

In Japan, there is a long history of the consumption of miso, fermented soybean paste, which is suggested to possess beneficial effects on human health. However, the mechanism behind these is not fully understood. To clarify miso’s effects on immune cells, we investigated its immunomodulatory functions in mice. Intake of miso did not alter the populations of B and T cells in spleen. However, intake of miso increase $CD69^{+}$ B cells, germinal center B cells, and the regulatory T cells. Anti-DNA IgM Abs, which was crucial for preventing autoimmune was increased by ingestion of miso. Furthermore, intravital imaging of the small intestinal epithelium by using a calcium biosensor mouse line showed that miso evoked Ca^{2+} signaling in a manner similar to probiotics. Thus, Ingestion of miso strengthens immune robustness by acting in both immunostimulatory and immune tolerance.

Miso, Immune system, Robustness

発表責任者：安達貴弘（tadachi.imm@mri.tmd.ac.jp）

講演番号：3E01-07
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:00～ ミーティングルーム E

ルテオリンによる肝臓での薬物代謝第２相酵素発現誘導に投与タイミングが及ぼす影響について
The involvement of administration timing in luteolin-induced phase 2 drug-metabolizing enzyme in liver.

○石野 正晃、北風 智也、牧山 敦志、芦田 均 (神戸大農)
○Masaaki ISHINO, Tomoya Kitakaze, Atsushi Makiyama, Hitoshi Ashida (Kobe Univ.)

概日リズムはほぼすべての生物が持つ 24 時間周期で振動する体内時計であり、生物の行動や生理、代謝を制御している。フラボンであるルテオリンは植物由来の食品に含まれる機能性成分であり、様々な健康促進効果を持つ。我々は通常の食事と同程度量のルテオリン(0.01-10 mg/kg BW)をマウスに 7 日間経口投与した。経口投与のタイミングは ZT10 と ZT22(zeitgeber time:明周期開始時刻を ZT0、暗周期開始時刻を ZT12 とする体内時計の時刻)それぞれで行い、最終投与の 2 時間後に解剖を行った。肝臓における Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (NRF2)の活性化とその下流遺伝子である薬物代謝第２相酵素の発現について測定した。その結果、マウスの活動開始期である ZT22 に投与した群でのみルテオリンは薬物代謝第２相酵素を誘導した。また、血中のルテオリンアグリコンと抱合体量について分析し、投与タイミングがルテオリン動態に与える影響について調べた。その結果、アグリコン量のみが ZT10 と比べて ZT22 で上昇した。腸管でルテオリンの抱合化を行うグルクロン酸転移酵素や硫酸転移酵素が概日リズムの影響を受けていることから、これらの酵素の日内変動が上記の結果に影響していると考察している。

The circadian rhythm is a biological clock oscillating in 24-hour cycles and controls the behavior, physiology and metabolism of organisms. The flavone luteolin is a functional property in plant-derived foods and has been reported its various health-promoting effects. Mouse was orally administered low dose of luteolin (0.01-10 mg/kg BW)for 7 days. The oral administration was timed at ZT10 or ZT22(zeitgeber time: time of internal clock, ZT0 as the start of light phase and ZT12 as dark phase), respectively and dissection was performed 2 hours after the last dose. We measured the activation of nuclear factor erythroid 2-related factor 2(NRF2) and the expression of its downstream gene, phase 2 drug-metabolizing enzyme in the liver. Its result showed luteolin induced phase 2 drug-metabolizing enzyme only in ZT22, the start of active phase. The levels of luteolin aglycone and its conjugate was measured to determine the effect of administration timing on luteolin pharamacokinetics. There was no change in the amount of conjugate, but the amount of aglycones was higher in the ZT 22 group compared to ZT10 group.

luteolin, phase 2 drug-metabolizing enzyme, circadian rhythm

講演番号：3E01-08
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:00～ ミーティングルーム E

アルツハイマー病初期における脳中プラズマローゲンおよび関連リン脂質の解析

Analysis of plasmalogens and related phospholipids in the brain of Alzheimer's disease at the early stages

○野間口 早紀、乙木 百合香、仲川 清隆、加藤 俊治、伊藤 隼哉、高須 蒼生、板谷 麻由子、清水 直紀、宮崎 瑠璃子、中務 絵梨子、山田 皓輝（東北大院農・機能分子解析学）
○Saki NOMAGUCHI, Yurika OTOKI, Kiyotaka NAKAGAWA, Shunji KATO, Junya ITO, Soo TAKASU, Mayuko ITAYA, Naoki SHIMIZU, Ruriko MIYAZAKI, Eriko NAKATSUKASA, Hiroki YAMADA (Food and Biodynamic Chemistry Laboratory, Tohoku Univ.)

【背景・目的】アルツハイマー病（AD）の初期から、脳内においてリン脂質（PL）の 1 つであるプラズマローゲン（Pls）の減少が報告され、その原因としてホスホリパーゼの活性化などによる Pls の分解（Lyso PL の増加）、および Pls 合成系の低下（alkyl-PL の低下）などが考えられる。しかし、Pls の分解物や合成中間体の分析はほとんどなされておらず、AD 病態における Pls の減少原因は不明である。そこで、本研究では、AD モデルマウスを用い、AD 病態の初期段階における脳の Pls およびその分解物や合成中間体の分析を行い、AD 病態と Pls の関連を明らかにしようとした。
【方法】雄性 AD モデルマウス[1]（$APP^{NL\text{-}G\text{-}F/NL\text{-}G\text{-}F}$, n=18）と、その野生型（C57BL/6J, n=17）を使用した。AD 病態初期段階（7 ヶ月齢）で Y 字迷路テストにて学習記憶を評価した後解剖し、脳を得た。脳内アミロイドβ量は ELISA により測定した。また、LC-MS/MS によって Pls をはじめとする PL を定量した[2]。【結果・考察】野生型と比較して AD 病態初期の AD モデルマウスでは学習記憶に差は見られなかったものの、脳内のアミロイドβ濃度が高値であった。また、脳内の Pls 濃度やその他の PL 濃度に有意な差がみられなかった一方で、その分解物である一部の Lyso PL 濃度（Lyso Pls、1-acyl-2-lyso PL）が AD モデルマウス脳内で比較的高値であった。このことから、ホスホリパーゼ A2 の活性レベルが AD 病態初期から増加していることが示唆された。現在脳内の総 PL 量の解析を進めており、AD 病態初期における PL の代謝異常についてより明確になることが期待される。
＊本研究の一部は、農研機構生研支援センター「「知」の集積と活用の場による研究開発モデル事業」の支援を受けて実施した。

Reduction of plasmalogen (Pls) has been reported in the brain from Alzheimer’s disease (AD) patient even at early stage. The possible causes of this reduction is degradation of Pls (e.g. increase of phospholipase activity), and/or decline in synthesis activity, although, they are still unknown due to lack of detail analysis of phospholipid (PL) species. Therefore, to reveal the cause of Pls reduction in AD pathology, we analyzed Pls, its degradation products (Lyso PL) and synthesis intermediates (alkyl-PL) in the brain of AD model mice[1] (n=18, 7 months) and wild type mice (n=17, 7 months). As the result, while Pls reduction was not observed in AD mode mice, elevation of Lyso Pls and 1-acyl-2-lyso-PL were observed in the brain from AD model mice compared to wild type, suggesting phospholipase A2 activation in the early stage of AD.

1) T. Saito *et al., Nat. Neurosci*. 2014, 17, 661-3　2) Y. Otoki *et al., J. Pharm. Biomed. Anal.* 2017, 134, 77-85.

Plasmalogen, Phospholipid, Alzheimer's desease

講演番号：3E01-09
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:00～ ミーティングルーム E

脂肪摂取による一過性酸化ストレスの検出

Detection of high-fat meal induced postprandial oxidative stress

○數村 公子[1,2]、竹内 康造[2]、九澤 香織[3]、波多野 薫子[1]、永井 雅[4]、美和 登志幸[5]、服部 将貴[1]、内藤 通孝[3]、大澤 俊彦[6]([1]浜松ホトニクス・GSCC、[2]浜松ホトニクス・中研、[3]椙山女学園大・生活科学、[4]ヘルスケアシステムズ、[5]浜松ホトニクス・電子管、[6]愛知学院大・心身)
○ Kimiko KAZUMURA[1,2], Kozo TAKEUCHI[2], Kaori KUZAWA[3], Yukiko HATANO[1], Masashi NAGAI[4], Toshiyuki MIWA[5], Masaki HATTORI[1], Michitaka NAITO[3], Toshihiko OSAWA[6] ([1]Hamamatsu Photonics GSCC, [2]Hamamatsu Photonics CRL, [3]Sugiyama Jogakuen Univ., [4]Healthcare Systems Co. Ltd.,, [5]Hamamatsu Photonics ETD, [6]Aichi Gakuin Univ)

慢性的な高血糖や脂質異常が様々な疾患の危険因子であることはよく知られているが、近年食後の一過性の高血糖や脂質異常に起因する酸化ストレスも疾患発症を加速する要因となることが明らかになってきた。我々は、生体内の異変にいち早く反応する好中球をターゲットとして、疾患発症や老化促進に関与する活性バランスの乱れ（酸化ストレス、免疫低下等）を簡便に検出できる手法を開発している。本手法により、食後一過性の酸化ストレスの検出が可能か、健常若年女性 9 名による脂肪負荷試験で検討を行った。その結果について報告する。12 時間以上の絶食状態で試験食（OFTT クリーム:1g/kg）を摂取し、0，0.5，1，2，4，6 時間後に採血して測定に供するとともに、従来の酸化ストレスマーカーや脂肪代謝の指標となるトリグリセライド（TG）も測定した。TG は、摂取後 4 時間まで上昇を続け 6 時間で 0 時間の値に戻った。好中球活性は、摂取後 0.5 時間から上昇が始まり、2 時間後に 0 時間の値と比較して有意（Dunnett 検定）に高値となった。その後緩やかに減少したが、6 時間では 0 時間値までは戻らなかった。摂食による酸化ストレスが、断続的かつ継続的に起こっていることが示唆される結果となった。本手法が、摂食による酸化ストレス評価やそれを抑制する機能性成分の評価に利用できる可能性が得られた。本研究は SIP(管理法人:生研支援センター)の支援を受けた。

Although chronic hyperglycemia and hyperlipidemia are well known to be risk factors for various diseases, it has recently become clear that oxidative stress caused by postprandial transient hyperglycemia and hyperlipidemia are also factors that potentially accelerate disease onset. We have focused on neutrophils, which respond quickly to in vivo abnormalities, and developed methods to easily detect balances in their activity (e.g., oxidative stress and immunity) by using a tiny amount of whole blood. To examine whether this method could detect transient postprandial oxidative stress, we here conducted a fat-loading test in 9 healthy young women. Blood samples were taken at 0, 0.5, 1, 2, 4, and 6 hours after ingestion of a test meal (OFTTcream:1g/kg) in a fasted state for more than 12 hours. At the six time points, neutrophil activity, conventional oxidative markers and triglycerides (TG), an indicator of fat metabolism, were measured. TG rose to 4 hours and returned to the 0-hour value at 6 hours. Neutrophil activity increased gradually and became significantly higher at 2 hours compared to the 0-hour value. It then decreased slowly but did not return to the 0-hour value at 6 hours. Our results suggest that the oxidative stress caused by ingestion is intermittent and continuous. In total this method could be useful to evaluate postprandial oxidative stress and development of functional ingredients to inhibit it.

oxidative stress, presymptomatic disease, innate immune response

発表責任者：數村公子（kimiko.kazumura@hpk.co.jp）

講演番号：3E01-10
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:00～ ミーティングルーム E

ソバ全層粉の長期摂取が老化促進マウス SAMP8 の学習記憶能力と腸内細菌叢に及ぼす影響

Effects of long-term administration of buckwheat whole fluor on cognitive function and gut microbiota in senescence-accelerated mouse prone 8

○岡畠 千鶴[1]、萩原 一晃[2]、山崎 慎也[2]、高橋 佑汰[2]、中村 宗一郎[1]、片山 茂[1,3]([1]信州大院・農、[2]長野県工技センター、[3]信州大・バイオメディカル研)
○ Chizuru Okahata[1], Kazuaki Hagiwara[2], Shinya Yamazaki[2], Yuta Takahashi[2], Soichiro Nakamura[1], Shigeru Katayama[1,3] ([1]Shinshu Univ. Grad. Sch. Sci., Dept. Agric, [2]Nagano Pref. Ind. Tech. Ctr., [3]Shinshu Univ. IBS)

ソバ粉摂取による認知機能低下抑制作用について、老化促進モデルマウス SAMP8 を用いて検討した。SAMP8（雄性、17 週齢）のコントロール群には AIN-93M 食を、試験群にはソバ全層粉 5%、ソバ表層粉 5%を含む試験食を 26 週間自由摂取させた。バーンズ迷路試験と受動回避試験を行った結果、コントロール群およびソバ表層粉摂取群に対して、ソバ全層粉摂取群において学習記憶能力の改善が認められた。ソバ全層粉摂取群では、脳海馬において、転写因子 CREB のリン酸化亢進、神経栄養因子 BDNF、神経伝達調節因子 Arc および神経細胞マーカーNeuN の発現が増加することが示された。これより、ソバ全層粉摂取は脳海馬のシナプス可塑性を増強させることで認知機能低下を抑制させることが示唆された。盲腸内容物から DNA を抽出し、16S rRNA 領域を増幅した PCR 産物を対象に次世代シーケンサーにて菌叢解析を行った。その結果、ソバ全層粉群に特異的な Operational Taxonomic Units（OTUs）として高分岐デキストリン産生菌の *Muribaculaceae* が選出された。また、コントロール群と比較して酪酸産生菌の *Ruminiclostridium* や酢菌産生菌の *Alistipes* が増加することが示された。以上の結果より、ソバ全層粉摂取による認知機能低下抑制作用には、腸内細菌叢の代謝産物が関与する可能性が示された。

We here investigated whether long-term oral administration of buckwheat can suppress age-related cognitive decline in a senescence-accelerated mouse prone 8 (SAMP8). For 26 weeks, 17-week-old male SAMP8 mice were fed a standard diet containing 5% (w/w) whole or surface fluor of buckwheat, respectively. The mice fed with the whole fluor of buckwheat improved the behavioral responses compared with the control and the buckwheat surface fluor-fed groups in the Barnes maze and passive avoidance tests. Phosphorylation of CREB and increases in BDNF, Arc, and NeuN in the hippocampus was increased by feeding the buckwheat whole flour. The 16S rRNA profiling analysis of the cecal microbiota indicated that highly-branched dextrin-producing bacteria *Muribaculaceae* was specific operational taxonomic units (OTUs) in the buckwheat whole fluor-fed group. Further, the feeding of buckwheat whole fluor increased the population of *Ruminiclostridium* and *Alistipes*, which are butyrate and lactic acid-producing bacteria, respectively. These suggest that long-term administration of buckwheat whole flour could suppress cognitive decline via the bioactive metabolites produced from microbiota fermentation in SAMP8.

SAMP8, BDNF, microbiota

発表責任者：片山茂（skata@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：3E01-11
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:00～ ミーティングルーム E

ビタミン C 誘導体はコラーゲンの糖化に影響を与える

Vitamin C derivatives affect glycation of collagen

○望月 萌恵[1]、野村 義宏[1]、松本 大志[2]、太田 涼介[2] ([1]東京農工大学、[2]新日本製薬株式会社)
○Moe MOCHIZUKI[1], Yoshihiro NOMURA[1], Daishi MATSUMOTO[2], Ryosuke OTA[2] ([1]Tokyo University of Agriculture and Technology, [2]Shinnihonseiyaku Co)

【目的】皮膚の加齢老化の一因としてコラーゲン線維の糖化があり、その結果として皮膚の柔軟性の低下、シワ形成に関与する。本研究ではコラーゲンの重合に重要な役割を果たすビタミン C がコラーゲンの糖化に与える影響を明らかにすることを目的として、三次元培養皮膚モデルのコラーゲンゲルをリボースで処理することで老化皮膚モデルを作製し、ビタミン C 誘導体の評価を行った。
【方法・結果】I 型コラーゲン溶液に線維芽細胞を分散させ、中性 37℃にすることでゲル化させ、30 mM リボース下で 7 日間コラーゲンゲルを浸漬することにより、老化皮膚モデルを作製した。リボースの存在により有意なコラーゲンゲル収縮阻害が認められた。抗糖化物質であるアミノグアニジン (AG) はリボースによるゲル収縮阻害を有意に抑制した。アスコルビルグルコシド (AA2G) およびビタミン C(VC)-コラーゲンの添加でもゲル収縮阻害を抑制する傾向が認められた。ヒアルロン酸(HA)と MMP2,9 の産生量は変化が見られなかった。
【結論】リボースを添加することでコラーゲンゲル収縮阻害が起こり、糖化皮膚モデルを作製することができた。AA2G と VC-コラーゲンの添加によりリボースによるコラーゲンゲル収縮を抑制し、抗糖化作用を示すことが示唆された。
[Purpose] The main cause of skin aging is glycation of collagen fibers. Glycated collagen has reduced flexibility and induced wrinkle formation. The three-dimensional cultured skin model is also very useful as an alternative to animal experiments. The purpose of this study is to clarify the effect of vitamin C, which is essential for collagen polymerization, on glycation of collagen.
[Methods and Results] The aging skin model was prepared as follows. The skin fibroblasts were dispersed in type I collagen solution, and incubated at 37 ℃. The collagen gel was incubated in 30 mM ribose for 7 days. Significant inhibition of collagen gel contraction was observed by the addition of ribose. Aminoguanidine (AG), a common antiglycation substance, significantly suppressed the inhibition of gel shrinkage. The present of Ascorbyl Glucoside (AA2G) or Vitamin (VC)-collagen inhibited the suppress collagen gel contraction. There was no change in the production of hyaluronic acid (HA) and MMP2,9.
[Conclusion] Ribose caused the glycation of collagen gel and inhibited the collagen gel contraction. Ribose treated collagen gel was a glycated skin model. It is considered that AA2G and VC-collagen was one of the anti-glycation materials.

glycation of collagen, skin aging, ascorbic acid

講演番号：3E01-12
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:00～ ミーティングルーム E

市販米味噌の抗糖化活性

Antiglycation activity of commercial rice miso

○瀬戸山 央、橋本 知子（地方独立行政法人神奈川県立産業技術総合研究所）
○ Ou SETOYAMA, Tomoko HASHIMOTO (Kanagawa Institute of Industrial Science and Technology (KISTEC))

【目的】
米味噌は大豆に米麹、食塩を加えて醸造する発酵調味料である。同じ原材料で醸造する発酵調味料として醤油があり、醤油が抗糖化活性を有することはすでに知られている。一方、米味噌の抗糖化活性についてはこれまで明らかにされておらず、抗糖化活性があるかは不明である。本研究では、市販の米味噌の抗糖化活性を明らかにすること、およびその関与成分を推定することを目的とした。
【方法】
市販米味噌6種類を選定し、各溶媒（水、50%メタノール、70%メタノールおよび 99%メタノール）にて抽出したものを味噌抽出液とした。各味噌 5g に各溶媒 20ml を加え、30℃、120rpm で1時間振盪抽出を行った。各味噌抽出液の抗糖化活性測定は、蛍光性 AGEs 生成抑制作用測定により行った。また成分分析として、総ポリフェノール定量および LC-MS によるイソフラボン類（ダイゼイン、ゲニスチン、ゲニステイン、グリシテイン、ダイジン、グリシチン）の定量を行った。
【結果】
試料とした米味噌すべてで蛍光性 AGEs 生成抑制作用が認められ、抗糖化活性を有していることが明らかとなった。また各溶媒で抽出した結果、99%メタノール抽出液の抗糖化活性の関与成分として、ポリフェノール類、イソフラボン類が示唆された。70%メタノール抽出液の抗糖化活性の関与成分として、イソフラボン類以外のポリフェノール類の関与が示唆された。50%メタノールおよび水抽出液の抗糖化活性の関与成分は、ポリフェノール類、イソフラボン類以外であることが示唆された。

Miso is a traditional fermented seasoning. The raw materials for rice miso are soybeans, rice koji, and salt. The purpose of this study is to clarify the anti-glycation activity of commercially available rice miso and to estimate the components involved.

Six kinds of rice miso were extracted with a solvent, and the effect of suppressing the formation of fluorescent AGEs was measured. In the component analysis, total polyphenols and isoflavones were analyzed.

As a result, rice miso was found to have anti-glycation activity. It was suggested that polyphenols and isoflavones are involved in the anti-glycation activity.

miso, antiglycation, isoflavone

発表責任者：瀬戸山央（setoyama@kistec.jp）

講演番号：3E01-13
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:00～ ミーティングルーム E

宿主由来の 12α水酸化胆汁酸は新規脂肪酸合成の亢進を介して脂肪肝を誘導する

Host-derived 12α-hydroxylated bile acids induce fatty liver via promoting de novo lipogenesis

○堀 将太、石塚 敏（北大農）
○Shota Hori, Satoshi Ishizuka (Hokkaido Univ.)

非アルコール性脂肪肝（NAFLD）は肝臓脂肪蓄積を特徴とする肝疾患である。肝臓脂肪蓄積は非アルコール性脂肪肝炎および線維化に先立って起こるイベントで、その原因物質の特定は NAFLD の予防・改善における最重要課題の 1 つである。我々は高脂肪食摂取ラットにおいて体液や組織における 12α 水酸化胆汁酸 （12αOH：肝臓で合成されるコレステロール異化産物の 1 つ）が肝臓脂肪蓄積と相関して選択的に上昇する事を発見した。驚くべきことに、主要な 12αOH であるコール酸（CA）をラットに少量与える事で高脂肪食摂取に類似した 12OH 増加環境を模倣したところ、非脂質前駆体からの新規脂肪酸合成（DNL）を制御する sterol-regulatory element-binding protein（SREBP1）遺伝子発現レベルの上昇を伴って脂肪肝を発症する事を見出した。このとき、バンコマイシン投与により腸内細菌由来の二次胆汁酸生成を低下させても、SREBP1 および脂肪肝の亢進は抑制されなかった。CA 群では DNL の基質になる門脈血中酢酸および肝臓中グルタミン酸濃度が上昇しており、重回帰分析により SREBP1 遺伝子発現との組み合わせが肝臓 TG 蓄積の有意な予測因子になる事を見出した。宿主由来の 12αOH は、DNL 基質の供給および肝臓 SREBP1 の発現上昇による DNL を介して NAFLD を起こす原因物質の 1 つであると推察される。

Hepatic steatosis is the hallmark feature of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). However, the causal factor is unknown. 12α-hydroxylated bile acid (12αOH) is an end product of cholesterol, and we previously found that the concentrations in body fluid and tissues correlate with hepatic steatosis in high-fat diet-fed rats. Surprisingly, dietary supplementation in rats with cholic acid (CA), a major 12αOH, reproduces a bile acid environment resembling that observed in high-fat diet-fed rats and induces hepatic steatosis with increased sterol-regulatory element-binding protein (SREBP1) mRNA expression in the liver, which positively regulates *de novo lipogenesis* (DNL). Regardless of the suppression of the gut microbiota-derived secondary bile acid production using vancomycin, the CA diet induced hepatic TG accumulation and enhancement of the SREBP1 mRNA expression. Intriguingly, there were increases in the concentrations of portal acetate and liver glutamic acid, which can be a source of DNL in the CA-fed rats. Multiple regression analysis identified the acetate and L-glutamic acid in combination with liver SREBP1 mRNA expression could serve as positive predictors of liver TG concentration. The present study proposes that primary 12αOH rather than secondary 12αOH contributes to the induction of hepatic steatosis via DNL in the liver and can be a causal factor of NAFLD.

bile acid, fatty liver, high-fat diet

発表責任者：石塚 敏（zuka@chem.agr.hokudai.ac.jp）

講演番号：3E01-14
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:00～ ミーティングルーム E

異なる脂質由来高脂肪食に対するマウスの選択性と過体重に与える影響

Selection of different fat based-high fat diets and induction of overweight in mice

○松坂 祐希、松山 弘希、田中 航、榊原 啓之 (宮崎大農)
○Hiroki MATSUZAKA, Hiroki MATSUYAMA, Wataru TANAKA, Hiroyuki SAKAKIBARA (Univ. Miyazaki)

我々は高脂肪食誘発性肥満モデルを用い，高脂肪食の摂取時刻と脂質の種類の違いが過体重へ与える作用を評価しているが，その過程で，大豆油由来高脂肪食を自由摂食させたマウスに対し，大豆油以外の脂質由来高脂肪食をある時間帯にのみ与えると，積極的に摂取する高脂肪食と摂取しない高脂肪食があった。この選り好みは，マウスの脂質に対する嗜好に起因すると考えられる。本研究では，異なる脂質で作製した高脂肪食に対する選択性と過体重へ与える影響を評価した。

大豆油（SHF)，ラード（LHF)，魚油（FHF）を 30％含む改変 AIN-93G 精製食と対象食（10％大豆油含有 AIN-93G 食：10%SF）から選択した 2 つの食餌を 1 つのケージ内に入れ，雄性 C57BL/6 マウスに 8 週間自由摂食させた（10%SF+10%SF 群；10%SF+SHF 群；SHF+LHF 群，SHF+FHF 群)。

2 つの食餌の摂取量は 10%SF+10%SF 群と 10%SF+SHF 群で差異はなく，SHF+LHF 群ではラード食，SHF+FHF 群では大豆食の摂取量が有意に高かった。一方，すべての群の総摂取エネルギーは同じであったにもかかわらず，摂取 8 週時の体重は，SHF+LHF 群でのみ 10%SF+10%SF 群と比較して有意に増加した。以上の結果は，マウスの脂質に対する嗜好が脂質の種類によって異なること，摂取エネルギーが同じであっても，ラード含有高脂肪食が含まれると，過体重が惹起されることを示唆している。

In this study, we evaluated the effects of different fat based-high fat diets on their consumption amounts and induction of overweight using mice model.

We employed four AIN-93G based purified diets: 10% soybean oil diet (10%S), 30% soybean oil high fat diet (SHF), 30% lard high fat diet (LHF) and 30% fish oil high fat diet (FHD). Two of them were put on one cage as following: 10%SF+10%SF; 10%SF+SHF; SHF+LHF; and SHF+FHD, and male C57BL/6 mice were allowed to freely access to both diets for 8 weeks.

The food consumptions were not different at 10%SF+10%SF group and 10%SF+SHF group. On the other hand, consumption of LHF diet and SHF diet were significantly larger in SHF+LHF group and SHF+FHF group, respectively. The body weights were significantly increased only in SHF+LHF group comparing with 10%SF+10%SF, although daily total energy intakes were similar. These results indicated that mice have their own likes/dislikes for fat origins, and such preference affects on induction of overweight.

mouse, high fat diet, preference

講演番号：3E01-15
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:00～ ミーティングルーム E

転写因子 ATF4 を介して FGF21 の発現を亢進する新規食品成分の探索・解析

Berberine increases expression of anti-obese hormone FGF21 through ATF4

○菱田 遼太郎、清水 誠、藤木 航平、山内 祥生、佐藤 隆一郎（東京大学）
○Ryotaro HISHIDA, Makoto SHIMIZU, Kohei FUJIKI, Yoshio YAMAUCHI, Ryuichiro SATO (Tokyo Univ.)

肝臓において合成、分泌される線維芽細胞増殖因子 FGF21 は白色脂肪組織における糖取り込みや脂肪滴分解などを介した抗肥満効果を有する。FGF21 はストレス応答性転写因子 ATF4 の標的遺伝子であることが知られている。本研究では ATF4 活性化を介して FGF21 発現を亢進する食品成分の探索を行った。

350 種類の食品成分ライブラリーを用いて ATF4 を活性化する食品成分を探索した。ATF4 の翻訳制御領域を含むプラスミドを HEK293 細胞に導入し、ルシフェラーゼアッセイによるスクリーニングを行った。その結果、キハダなどに含まれるアルカロイド Berberine が ATF4 を活性化することを見出した。 ヒト肝癌由来細胞 HepG2 細胞を用いた検証の結果、Berberine による ATF 依存的な FGF21 の発現誘導が示された。Berberine による ATF4 の活性化機構を解析した結果、Berberine により ATF4 の翻訳制御因子 eIF2α のリン酸化が確認された。また siRNA を用いた eIF2α キナーゼのノックダウン実験の結果、HRI が Berberine による ATF4 の活性化に重要であることが示された。様々な類縁体を用いた検証の結果、Berberine 以外のアルカロイドによる ATF4 の活性化は確認されなかった。

以上の結果より、Berberine は HRI-ATF4 経路の活性化を介して FGF21 の遺伝子発現を正に制御することが示された。

Fibroblast growth factor FGF21, which is secreted from the liver, has anti-obesity function through activation of glucose uptake and lipolysis of white adipose tissue. FGF21 is known to be a target gene of the transcription factor ATF4. In this study, we explored food factors which enhanced FGF21 expression through ATF4. We searched food factors from the library including 350 kinds of nutrient facts. We used a reporter plasmid which contained translational regulatory region of ATF4 and performed screening by luciferase assay in HEK293 cells. From this screening, we identified berberine, which was contained in Kihada, as an activator of ATF4. Berberine increased FGF21 expression through ATF4 activation in HepG2 cells. We analyzed the mechanism of ATF4 activation by berberine in HepG2 cells. The result of knocking down eIF2α kinase genes revealed that HRI is important for the effect of berberine. These results showed that berberine is a novel food factor which increases expression of FGF21 through HRI-ATF4 pathway.

FGF21, ATF4, Berberine

発表責任者：菱田遼太郎（ryotaro-nimo@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3E03-01
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:00～ ミーティングルーム E

ヒト型 PXR マウスにおけるビタミン K の胆汁酸代謝関連遺伝子発現への影響

Effect of vitamin K on the gene expression related to bile acid metabolism in humanized PXR mice

○錦戸 迪哉、Sultana Halima、渡邉 きみか、大崎 雄介、駒井 三千夫、白川 仁（東北大・院農・栄養学）
○ Michiya NISHIKIDO, Halima SULTANA, Kimika WATANABE, Yusuke OHSAKI, Michio KOMAI, Hitoshi SHIRAKAWA (Lab. Nutrition, Grad. Sch. Agri. Sci., Tohoku Univ.)

核内受容体 PXR（pregnane X receptor）は代謝酵素や輸送体の遺伝子発現を制御している転写調節因子である。PXR は種間で異なるリガンド選択性を示すため、ヒト PXR（hPXR）リガンドに応答する hPXR ノックイン（KI）マウスが開発されている。ビタミン K_2 の一種であるメナキノン-4（MK-4）は hPXR のリガンド活性を示す。本研究では餌中のビタミン K（VK）を制限した試験食を KI マウスに与えて、肝臓における代謝酵素、特に胆汁酸代謝に関連する酵素遺伝子の発現に及ぼす影響について解析を行った。

野生型（WT）、および KI マウス（14 週齢、雌雄）に Control 食、または VK free 食を 28 日間給餌した。6 時間の絶食後、肝臓および消化管を採取し、胆汁酸代謝関連遺伝子の mRNA 量を定量 RT-PCR により測定した。また、肝臓中の VK 量を蛍光 HPLC 法で、総胆汁酸量を酵素比色法により測定した。

KI 雌マウスの肝臓において、胆汁酸合成遺伝子である *Cyp7a1* mRNA 量が Control 食群に対して VK free 食群で有意に低下しており、総胆汁酸量も同様の傾向が見られた。このことから、VK は hPXR を介して胆汁酸合成遺伝子の発現及び胆汁酸代謝に影響を与えることが示唆された。

Nuclear receptor PXR (pregnane X receptor) regulates the expression of genes encoding metabolic enzymes and transporters. Since the ligand specificity of PXR varies among species, humanized PXR (KI) mouse was developed to enable functional analysis of human PXR (hPXR) ligands in rodent models. Menaqinone-4 (MK-4), one of vitamin K2, works as a ligand of hPXR and modulates certain gene expression. In this paper, we analyzed the alternation of gene expression involved in bile acid metabolism of hPXR mice fed vitamin K (VK) restricted diet.

Wild type (WT) and KI mice (14-week-old, male and female) were fed either control or VK free diets for 28 days, then organs were collected after 6 h fasting. After the isolation of total RNA from the liver, mRNA levels of genes encoding bile acid syntheses and bile acid transporters were measured by quantitative RT-PCR. Total bile acid in the liver was measured by the enzyme colorimetric method.

VK free diet significantly reduced the mRNA level of *Cyp7a1* in the liver of female KI mice. Hepatic total bile acid content also tended to be decreased in female mice fed VK free diet. These results suggest that dietary VK could affect bile acid metabolism by the modulation of the gene expression related to bile acid synthesis via hPXR.

Pregnane X receptor, Bile acid synthesis, Vitamin K

講演番号：3E03-02
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:00～ ミーティングルーム E

ビタミン B_{12} 欠乏が線虫（*C. elegans*）のジチロシン含量に及ぼす影響

Effect of dityrosine level during vitamin B_{12} deficiency in *Caenorhabditis elegans*

○美藤 友博[1,2]、岡本 奈穂[2]、山本 葵[1]、藪田 行哲[1,2]、渡邉 文雄[1,2]（[1]鳥取大農、[2]鳥取大院連農）
○ Tomohiro BITO[1,2], Naho OKAMOTO[2], Aoi YAMAMOTO[1], Yukinori YABUTA[1,2], Fumio WATANABE[1,2] ([1]Tottori Univ., [2]United Grad. Sch. Agric. Sci., Tottori Univ.)

【背景・目的】生体内において、B_{12} は奇数鎖脂肪酸の異化代謝に関与するメチルマロニル CoA ムターゼならびにメチオニンの生成に関与するメチオニンシンターゼの補酵素として機能する。近年、ヒトのモデル生物である線虫（*C. elegans*）を用いた研究では、B_{12} 欠乏症はビタミン C をはじめ生体内の抗酸化物質を減少させることで、著しい酸化ストレス障害を誘発することを明らかにしている。本研究では B_{12} 欠乏がビタミン C を補酵素とするコラーゲン代謝に及ぼす影響を詳細に検討した。
【方法】コントロール線虫と B_{12} 欠乏線虫はそれぞれ B_{12} 添加および B_{12} 無添加培地で 5 世代間生育させ調製した。B_{12} 欠乏線虫へのビタミン C の供給実験では、*L*-ascorbic acid 2-glucoside 添加培地で B_{12} 欠乏線虫を 3 世代間生育させた。アミノ酸分析機を用いてヒドロキシプロリン含量を測定し、コラーゲン量を評価した。コラーゲンの質の評価として、HPLC と ELISA 法を用いてジチロシン含量と終末糖化産物（AGEs）含量を測定した。また、線虫体内のジチロシンを蛍光免疫染色法で蛍光標識し、蛍光顕微鏡で観察した。
【結果・考察】B_{12} 欠乏線虫ではコントロール線虫と比較し、体内ビタミン C 含量の低下に伴い、コラーゲン含量の約 40% の減少を示した。また、B_{12} 欠乏はコントロール線虫と比較して AGEs 含量には変化を示さなかったが、コラーゲン量当たりのジチロシン含量は約 1.7 倍増加していた。この B_{12} 欠乏線虫のジチロシン含量の増加は B_{12} またはビタミン C を供給することで回復を示したことより、酸化ストレス障害の一端であると推察された。ジチロシンはアルツハイマー病の進行に関連が深いアミロイドβの凝集に関与することが知られている。現在は、アルツハイマー病のモデル線虫を用いて B12 欠乏とアルツハイマー病の発症・進行の関連性について検討している。

【Abstract】Severe vitamin B_{12} deficiency can trigger megaloblastic anemia, developmental disorders, growth retardation, infertility, and neuropathy. Vitamin B_{12} deficiency was found to significantly decrease collagen level in *Caenorhabditis elegans*. The results of amino acid and high-performance liquid chromatograph analyses indicated that the cause of the decrease of collagen level by vitamin B_{12} deficiency was a severe decrease of vitamin C, a cofactor of collagen biosynthesis, level in the body. Furthermore, dityrosine, an index of the quality of collagen, level in per 1 mg collagen was significantly increased in vitamin B_{12}-deficient worm relative to control.

Vitamin B_{12}, *Caenorhabditis elegans*, Dityrosine

講演番号：3E03-03
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:00～ ミーティングルーム E

ヒト苦味受容体の遺伝子多型と唾液中亜鉛関連因子の解析

Analysis of Genetic Polymorphisms in Human Bitter Taste Receptor and Zinc-related Taste Factors in Saliva

○川又 美南、長谷川 雄大、鈴木 綾、大崎 雄介、駒井 三千夫、白川 仁（東北大院・農）
○Minami KAWAMATA, Kazuhiro HASEGAWA, Aya SUZUKI, Yusuke OHSAKI, Michio KOMAI, Hitoshi SHIRAKAWA (Tohoku Univ.)

【背景・目的】ヒトの苦味受容体 TAS2R（taste receptors, type 2）は 25 種類存在する。人工的な苦味物質 phenylthiocarbamide（PTC）と 6-n-propylthiouracil（PROP）の苦味感受性は、TAS2R38 の遺伝子型によって区別され、3 つの SNP（P49A, A262V, V296I）の組み合わせによって予測できる。また、炭酸脱水酵素（CA）は活性部位に亜鉛を有しており、味覚に関与するとされている。さらに、亜鉛欠乏が味覚障害につながることは広く知られている。このように、亜鉛と味覚と CA6（CA のアイソザイム）は互いに関係があることが分かっているが、亜鉛と TAS2R38 の関連性については欧州での研究があるのみである。本研究では、TAS2R38 の遺伝子多型が唾液中亜鉛関連因子にどのような影響を与えるのか、日本人被験者において解析した。
【方法】研究に同意が得られた東北大学の健常者、計 113 名（21.7±1.5 歳）を対象とした。酸味刺激下で耳下腺唾液を採取し、亜鉛濃度、タンパク質濃度、CA 活性を測定した。遺伝子多型解析には、頬粘膜組織由来 DNA を用いた。
【結果】TAS2R38 の遺伝子多型と唾液中亜鉛関連因子の間には関連性がほとんど認められず、先行研究とは異なる結果を得た。今後はより大きな母集団での研究が必要である。

Type 2 taste receptor (TAS2R) genes encode bitter-taste receptors that are activated by various bitter ligands. There are 25 human TAS2Rs, and the bitterness sensitivity to phenylthiocarbamide (PTC) and 6-n-propylthiouracil (PROP) is distinguished by the genotype of TAS2R38, and can be predicted by a combination of three SNPs (P49A, A262V and V296I). There have been few studies on the association between TAS2R38 gene polymorphism and salivary zinc-related taste factors. So, we analyzed the association between genetic polymorphisms in TAS2R38 and zinc-related taste factors in saliva using 113 healthy subjects. After all, there was no correlation in salivary zinc-related taste factors and genotype polymorphism of TAS2R38 which is not paralleled with previous European studies. Further studies with larger population are necessary.

tas2r38, zinc, genotype

講演番号：3E03-04
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:00～ ミーティングルーム E

ビタミン D は 11β-HSD1 の発現誘導を介して脂肪細胞の分化を制御する

Vitamin D regulates adipocyte differentiation by the induction of 11β-HSD1 expression

○中嶋 桃菜、三谷 畳一（信州大学）
○MOMONA NAKASHIMA, TAKAKAZU MITANI (Shinshu Univ.)

【目的】一般的に 2 型糖尿病は肥満者で発症しやすいとされているが、日本人においては痩身でも糖尿病を罹患する人が多いといった矛盾点がある。これには脂肪細胞の正常分化が関係している。分化した脂肪細胞ではグルコース輸送体（GLUT4）の発現が高く、インスリン刺激により血中グルコースが速やかに取り込まれる。一方、未成熟の脂肪細胞では GLUT4 の発現が低く、インスリン刺激により十分なグルコースの取り込みが行われない状態となる。従って脂肪細胞の正常分化は、血糖値の維持の観点から重要と言える。本研究では、栄養成分による脂肪細胞の正常分化の促進に着目し、ビタミン D が脂肪細胞の正常分化に及ぼす影響を解析した。
【方法と結果】ビタミン D の直接的な刺激が脂肪細胞の分化に与える影響を *in vitro* で解析した。細胞はマウス皮下脂肪組織から単離した脂肪前駆細胞を脂肪細胞へと分化させて用いた。ビタミン D はビタミン D 受容体（VDR）に結合し、標的遺伝子を制御する。ビタミン D による脂肪細胞の分化に VDR が関係するのかを検証するために、脂肪細胞の VDR をノックダウンした結果、脂肪細胞の主要転写因子 PPARγ、C/EBPα/β/δ の発現量が減少した。VDR は、脂肪細胞の分化最初期に一過的に発現量が増加することに対し、PPARγ は分化の後期にかけて発現量が増加する。両者の発現するタイミングが異なることから、VDR は間接的に PPARγ の発現を誘導する可能性が考えられた。そこで、グルココルチコイドの活性化酵素である 11β-ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼタイプ 1（11β-HSD1）が、VDR の間接的な PPARγ の誘導に関連するのではないかと予想した。ビタミン D が 11β-HSD1 の発現に及ぼす影響を解析した結果、11β-HSD1 はビタミン D の濃度依存的に発現量が増加し、VDR のノックダウンにより 11β-HSD1 の発現量は減少した。また、11β-HSD1 をノックダウンした脂肪細胞では、脂質蓄積量及び PPARγ の発現量が減少した。以上の結果から、ビタミン D は VDR と 11β-HSD1 を介して脂肪細胞の正常分化を誘導していることが示唆された。

We investigated the effect of vitamin D on the normal adipocyte differentiation by using adipose-derived stem cells. As a result, knockdown of vitamin D receptor decreased the expression of PPARγ and C/EBPs which induce adipocyte differentiation. Vitamin D increased the expression of 11β-HSD1, which metabolizes cortisone to cortisol, in a concentration-dependent manner. Knockdown of 11β-HSD1 suppressed normal adipocyte differentiation. Our result indicated that vitamin D induced normal adipocyte differentiation through induction of 11β-HSD1.

Vitamin D, 11β-HSD1, adipocyte differentiation

発表責任者：三谷畳一（mitani@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：3E03-05
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:00～ ミーティングルーム E

ラットにおけるビタミン A 体内濃度の性差

Gender differences in plasma and tissue vitamin A concentrations in rats

○守谷 浩子[1]、佐藤 遼太[1]、横堀 友希[2]、竹中 麻子[2]([1]明治大院農、[2]明治大農)
○HIROKO MORIYA[1], RYOTA SATO[1], YUKI YOKOBORI[2], ASAKO TAKENAKA[2] ([1]Grad. Meiji Univ., [2]Meiji Univ.)

【目的】我々は、性成熟後のラットにおいて、肝臓のビタミン E（VE）濃度および摂取 VE に対する尿への VE 代謝産物排泄割合がオスよりもメスで著しく高いという性差を報告してきた。本研究では、他の脂溶性ビタミンであるビタミン A（VA）の体内濃度の性差について検討を行った。
【方法】性成熟前後（3 あるいは 8 週齢）の雌雄の Wistar ラット、性腺除去（精巣除去および卵巣除去）した Wistar ラットを用い、肝臓 VA 含量、血漿 VA 濃度を HPLC により測定した。また retinol binding protein 4（RBP4）、transthyretin（TTR）の遺伝子発現を realtime PCR により、血漿中の濃度を ELISA により測定した。
【結果】性成熟後のラットにおいて、血漿 VA 濃度がメスよりもオスで高かったが、性腺除去の影響はなかった。肝臓 VA 濃度には性差はなかった。また、肝臓 RBP4 と TTR 遺伝子発現量は性成熟後のメスよりオスで高かったが、性腺除去の影響はなかった。血漿 RBP4 濃度は、性成熟前後のメスよりオスで高く、精巣除去で低下、卵巣除去で増加した。血漿 TTR 濃度に性差は見られなかった。また、卵巣除去で血中 RBP4 濃度が顕著に増加し、皮下脂肪組織の RBP4 mRNA も増加した。
【結論】血漿 VA 濃度はメスよりオスで高いという性差が示された。この性差は RBP4 の肝臓遺伝子発現と血中濃度の性差と一致するが、性ホルモンの影響を受けないことが明らかになった。一方、血中 RBP4 濃度はエストロゲンによっても抑制的に制御され、この制御は脂肪組織の RBP4 mRNA 量の変化を介して生じる可能性が示された。

[Purpose] The aim of this study is to investigate the gender differences of VA concentrations in plasma and tissues of rats. [Method] Liver and plasma VA concentrations and mRNA levels of VA binding proteins were measured using male and female rats before and after sexual maturation, female ovariectomized rats and male orchidectomized rats. [Conclusions] Plasma VA concentration is higher in males than in females. This gender difference is associated with hepatic gene expression and plasma level of RBP4 but is unaffected by sex hormones. In addition, plasma RBP4 levels are also regulated by estrogen, which may occur through changes in the amount of RBP-4 mRNA in subcutaneous adipose tissue.

vitamin A, gender difference, retinol binding protein

発表責任者：竹中麻子（takenaka@meiji.ac.jp）

講演番号：3E03-06
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:00～ ミーティングルーム E

α-トコフェロール輸送タンパク質の進化的起源の探索

Search for the evolutionary origin of α-tocopherol transfer protein

○矢竹 真[1]、増澤（尾崎） 依[2]、鈴木 博実[3]、竹中 麻子[3] ([1]明治大院農、[2]日大生資科、[3]明治大農)
○Shin YATAKE[1], Yori MASUZAWA-OZAKI[2], Hiromi SUZUKI[3], Asako TAKENAKA[3] ([1]Grad. Meiji Univ., [2]Nihon Univ., [3]Meiji Univ.)

【目的】α-トコフェロール輸送タンパク質（α-Tocopherol transfer protein,α-TTP）は主に肝細胞に発現するタンパク質である。α-TTP は肝細胞に取り込まれた食餌由来のビタミン E 同族体の中で α-トコフェロール（α-Toc）と優先的に結合して細胞膜まで輸送し、血中へ放出する機能を持つ。また α-Toc の体内濃度の維持にも α-TTP が必要であることが明らかになっている。α-TTP は哺乳類以外の鳥類、魚類などの脊椎動物においても発現し、α-Toc の選択的輸送に関与していることが報告されている。しかし、進化上どの生物が VE 体内輸送機能を獲得したのかは不明である。そこで本研究では、α-TTP の進化的起源を探索した。 【方法】まず、ヒト α-TTP のアミノ酸配列を基に BLAST 検索を行った。次に、アミノ酸配列の系統解析の結果から α-TTP を有する最も原始的な体制の生物と予測された頭索動物であるナメクジウオ（*Branchiostoma*）の VE 輸送活性を、培養細胞を用いて評価した。ヒガシナメクジウオ α-TTP （bTTP）あるいはラット α-TTP （rTTP）を強発現させたラット肝癌由来細胞株 McARH7777 細胞、または mock 細胞を、重水素標識（[²H]）したトコフェロールアセテート（[²H]α-TocAc）0.65 μg/ml を添加した DMEM 培地で 24 および 48 時間培養した。培養後、細胞と培地を回収し、[²H]α-TocAc および[²H]α-Toc を GC/MS にて分析した。細胞中と培地中の[²H]α-Toc の比率から VE 輸送活性を算出した。 【結果と考察】bTTP または rTTP を強発現させた細胞は、mock より有意に高い VE 輸送活性を示した。また、bTTP と rTTP の輸送活性には差がなかった。以上の結果から、頭索動物であるナメクジウオも α-TTP を発現し、哺乳類であるラットと同程度の VE 体内輸送を行うことが明らかになった。

Vitamin E has eight homologs: α, ß, γ, δ-tocopherols and tocotrienols. Alpha-tocopherol transfer protein (α-TTP) is a protein that selectively transports α-tocopherol (α-toc) from the liver into the blood and is essential for maintaining vitamin E level in mammals, birds and fish. In this study, we aimed to investigate the evolutionary origin of α-TTP. First, BLAST search was performed using the amino acid sequence of human α-TTP as a query. The results indicated that branchiostoma was the oldest organism in the phylogenetic tree with α-TTP. Next, α-toc transport activity of *Branchiostoma japonicum*, was evaluated using cultured cells transfected with branchiostoma or rat α-TTP expression vector. The results revealed that α-TTP of branchiostoma and rat had almost the same α-toc transport activity.

α-TTP, α-tocopherol, Branchiostoma

発表責任者：竹中麻子（takenaka@meiji.ac.jp）

講演番号：3E03-07
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:00～ ミーティングルーム E

Piper longum から単離した 4 種のネオリグナンのメラニン産生抑制作用
Melanogenesis inhibition by four neolignans isolated from *Piper longum*

○島村 真弥[1]、浮谷 基彦[1]、纐纈 守[2]、Lwin Mon Mon Myint[3]、仁科 淳良[1] ([1]日大理工、[2]岐阜大工、[3]FAME)
○Shinya Shimamura[1], Motohiko Ukiya[1], Mamoru Koketsu[2], Mon Mon Myint Lwin[3], Atsuyoshi Nishina[1] ([1]Nihon Univ., [2]Gifu Univ., [3]FAME)

【目的】
ミャンマーでは *Piper longum* L.（英名 Long pepper）を香辛料以外に生薬として抗炎症、皮膚保護の用途で用いている。*P. longum* はコショウ科コショウ属の植物でコショウに似た風味をもち、沖縄県では「ピパーチ」等の名で利用され「ヒハツ」と呼ばれることもある。我々は、ミャンマー伝統生薬の成分探索研究の一環として同植物の抽出物を精製した結果、新規物質を含む 4 種のネオリグナン類縁体を単離・同定した。また、B16 メラノーマ細胞を用いて単離化合物の生理活性を測定した結果、4 種の化合物のうちの 1 化合物は細胞毒性が認められない濃度でメラニン産生抑制作用を有することが分かった。今回、*P. longum* から単離したネオリグナン類とそれらのメラニン産生抑制作用を *in vitro* 実験系で評価した結果を報告する。

【結果と考察】
P. longum の酢酸エチル画分から 4 化合物を単離した。各化合物の MS や NMR スペクトルを先行文献と比較することによりそれぞれを(-)-licarin (**1**)、新規物質 (**2**)、eupomatenoid 7 (**3**)、eupomatene (**4**) と同定した。4 化合物のうち化合物 **2** は細胞毒性を示さない濃度でメラニン産生抑制作用が認められた。化合物 **2** のメラニン産生関連タンパク質に対する作用を測定した結果、同化合物が MITF のリン酸化とチロシナーゼ、TRP1、TRP2 の発現を抑制することが分かった。以上の結果から、*P. longum* 中の存在する化合物 **2** は MITF の転写活性を抑制することによりチロシナーゼ、TRP1、TRP2 の発現を抑制し、結果、α-MSH 誘導メラニン産生阻害が起こると推定した。

The ethyl acetate fraction of *P. longum* was purified by chromatography to isolate four compounds. By comparing the MS and NMR spectra of each compound with literatures, they were identified as (-)-licarin (**1**), novel substance (**2**), eupomatenoid 7 (**3**), and eupomatene (**4**). Among them, compound **2** was found to have inhibitory effects on melanogenesis at a concentration that did not show cytotoxicity. From the result of evaluation of compound **2** on melanogenesis-related proteins, it was found that compound **2** suppresses the phosphorylation of MITF and the expression of tyrosinase, TRP1 and TRP2. From the above results, it was deduced that the compound **2** down-regulated the expression of tyrosinase, TRP1 and TRP2 by suppression of the transcriptional activity of MITF, and as the result, α-MSH-induced melanogenesis was inhibited. Next, we will try to estimate the action mechanism of melanogenesis inhibition by docking simulation.

Piper longum, melanogenesis inhibition, neolignan

発表責任者：仁科淳良（nishina.atsuyoshi@nihon-u.ac.jp）

講演番号：3E03-08
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:00～ ミーティングルーム E

Vitex trifolia 成分の *in vitro* 糖尿病モデル系に対する作用
Effects of components from *Vitex trifolia* on the *in vitro* diabetes model system
○茂木 一稀[1]、浮谷 基彦[1]、纐纈 守[2]、Lwin Mon Mon Myint[3]、仁科 淳良[1] ([1]日大理工、[2]岐阜大工、[3]FAME)
○ Kazuki Motegi[1], Motohiko Ukiya[1], Mamoru Koketsu[2], Mon Mon Myint Lwin[3], Atsuyoshi Nishina[1] ([1]Nihon Univ., [2]Gifu Univ., [3]FAME)

【目的】
糖尿病は代表的な生活習慣病の一つで、日本人の約 2 割がすでに発病あるいはその予備軍と言われている。糖尿病に対応する医薬品はいずれも副作用を示すため、生薬成分による糖尿病の予防や改善は選択肢の一つとして意義があると考えられる。本研究では抗炎症、肝臓保護作用などが伝承されているミャンマー伝統生薬の 1 アイテム *Vitex trifolia* L.（英名 simpleleaf chastetree）に着目した。当研究室では *V. trifolia* からこれまでに 4 成分を単離して、それらの生理活性について報告しているが、今回、同植物（葉部）の抽出物から新たに 3 種の化合物を単離、同定した。今回、*V. trifolia* から新たに単離した 3 化合物を *in vitro* 抗糖尿病作用測定系で評価した結果を報告する。
【結果と考察】
V. trifolia のメタノール画分をクロマトグラフィーで精製し、3 化合物を単離した。各化合物の MS や NMR スペクトルを先行文献と比較することによりそれぞれを kusunokinin（**1**）、 aurantiamide acetate（**2**）、 auranamide（**3**） と同定した。3 種の単離化合物のうち **2**、**3** に 3T3-L1 細胞に対する細胞内脂質蓄積増加作用が認められた。生理活性が強かった化合物 **3** の 3T3-L1 細胞に対する作用を測定した結果、化合物 3 は、PPARγ、C/EBPα、(脂質分化誘導)、ACC、FAS、SCD（脂質合成）などの遺伝子発現を亢進し、perilipin、ATGL(脂質分解誘導)の遺伝子発現を抑制した。以上の結果から **3** は脂質生成を促進するとともに脂質分解を抑制することにより細胞内脂質蓄積を増やし、同時にアディポネクチンの遺伝子発現を亢進したことから抗糖尿病性が期待できると判断した。

Three compounds have been newly isolated from the extract of the *V. trifolia* (leaf) and identified as kusunokinin (**1**), aurantiamide acetate (**2**), and auranamide (**3**), respectively. Compound **2** and **3** were found to increase intracellular lipid accumulation in 3T3-L1 cells. From the results of evaluation of compound **3**, which had stronger effect, on adipogenesis-related genes in 3T3-L1 cells, it was found that compound **3** promoted gene expression of PPARγ, C/EBPα, (lipid differentiation induction), ACC, FAS, SCD (lipid synthesis). However, the gene expression of perilipin and ATGL (induction of lipid degradation) was suppressed. From the above results, antidiabetic effects can be expected in compound **3** since intracellular lipid accumulation was increased by promoting lipogenesis and suppressing lipolysis, and at the same time, gene expression of adiponectin was up-regulated.

3T3-L1 cells, diabetes, *Vitex trifolia*

発表責任者：仁科　淳良（nishina atsuyoshi@nihon-u.ac.jp）

講演番号：3E03-09
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:00～ ミーティングルーム E

Moringa oleifera 含有成分の *in vitro* 非アルコール性脂肪性肝疾患(NAFLD)モデル系に対する作用
Effect of compounds from *Moringa oleifera* on the non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) model system

○桐生 莉沙[1]、浮谷 基彦[1]、纐纈 守[2]、Lwin Mon Mon Myint[3]、薩 秀夫[4]、仁科 淳良[1] ([1]日大理工、[2]岐阜大工、[3]FAME、[4]前工大工)
○Risa Kiryu[1], Motohiko Ukiya[1], Mamoru Koketsu[2], Mon Mon Myint Lwin[3], Hideo Satsu[4], Atsuyoshi Nishina[1] ([1]Nihon Univ., [2]Gifu Univ., [3]FAME, [4]Maebashi Ins. Tech.)

【目的】
非アルコール性脂肪性肝疾患（NAFLD）は、現在、世界で最も一般的な慢性肝疾患であり、多くの国における有病率は 25%となっている。これまでに、NAFLD に対応する医薬品は認可されていないので、生薬成分を利用した当該疾患の予防には需要が見込まれる。本研究で取り扱う *Moringa oleifera* は、インドが主な生産国で、ミャンマーやタイでも主に食用として栽培されている。ミャンマーでは同植物の主に葉をジュースやスープの具材として利用している以外に高血圧や糖尿病に対する作用が伝承されている。本研究では *M. oleifera* の糖尿病に対する作用に着目し、NAFLD を制御する化合物の単離を試み、活性を有する画分から２つの化合物(**1, 2**)を単離・同定した。次に NAFLD の in vitro のモデル系で単離化合物の作用を測定するとともに、ウエスタンブロットにより、単離化合物の NAFLD 関連タンパク質に対する作用を測定することにより作用機構を推定した。

【結果と考察】
M. oleifera のメタノール画分から 2 種の化合物を単離した。各化合物の MS や NMR スペクトルを先行文献と比較することによりそれぞれを 1-Hydroxy-3-phenylpropan-2-yl benzoate (**1**)、Benzyl benzylcarbamate (**2**)と同定した。化合物 **1** の立体構造は単結晶Ｘ線構造解析によって決定した。両化合物には HepG2 細胞に対する毒性が認められず、化合物 **1** には濃度依存的な細胞内脂質蓄積の抑制作用が認められた。化合物 **1** の脂質産生関連タンパク質に対する作用を測定した結果、同化合物が脂質分解を促進するタンパク質発現を亢進することが分かった。一方化合物 **1** の作用は PPARα のアゴニストと類似していたことから、同物質が PPARα の活性を高め、さらに脂質分解系タンパクの発現を亢進することが細胞内脂肪蓄積抑制と関係していると推定した。

We are focusing on the effects of *M. oleifera* on diabetes and attempted to isolate compounds that regulate NAFLD. Two compounds (**1**, **2**) were isolated from *M. oleifera* and identified as 1-Hydroxy-3-phenylpropan-2-yl benzoate (**1**) and Benzyl benzyl carbamate (**2**), respectively. Compound **1** was found to have a concentration-dependent inhibitory effect on intracellular lipid accumulation in HepG2 cells. From the evaluation results of effects of compound **1** on lipogenesis-related proteins, it was found that compound **1** up-regulate the expression of lipolytic proteins. On the other hand, since the effects of compound **1** was similar to that of PPARα agonists, it was deduced that compound **1** enhances the activity of PPARα to induce the expression of lipolytic proteins.

HepG2, NAFLD, *Moringa oleifera*

発表責任者：仁科　淳良（nishina.atsuyoshi@nihon-u.ac.jp）

講演番号：3E03-10
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:00～ ミーティングルーム E

ホウレンソウとグリーンキウイのフィトール含量およびクロロフィル分解酵素の活性

Phytol contents and chlorophyll-degrading enzyme activities in spinach and green kiwi

○横坂 伸一、浅田 ゆり、松田 寛子、奈良井 朝子（日獣医大応生科）
○Shin-ichi Yokosaka, Yuri Asada, Hiroko Matsuda, Asako Narai (Nippon Veterinary and Life Science Univ.)

フィトールは、クロロフィラーゼ（CLH）、フェオフィチナーゼ（PPH）がクロロフィル類のフィチルエステル構造を加水分解することで生成する脂肪族アルコールであり、これまでに抗肥満、抗糖尿病につながる生理活性を示すことが報告されてきた。近年、生鮮青果物を磨砕して製造するスムージーが健康維持の点から注目されており、食材由来の CLH、PPH とクロロフィル類との反応によって生じるフィトールがスムージーの健康機能の一端を担う可能性が考えられる。しかし、生鮮青果物のフィトール含量や CLH、PPH の活性に関する知見は乏しい。

そこで本研究では、市販の野菜飲料 10 種（スムージー飲料を含む）と生鮮青果物（ホウレンソウ葉、グリーンキウイ果実）から、アセトンおよびヘキサンを用いてフィトールを抽出し、RP-HPLC で定量した。その結果、これらにフィトールが含まれることを確認できたため、次にホウレンソウ葉およびグリーンキウイ果実から硫安塩析により粗酵素を抽出してクロロフィル a と反応させた。反応中のフィトール増加量を RP-HPLC を用いて測定し、CLH、PPH の活性をフィトール生成活性として算出した。両酵素の温度依存性を調べたところ、ホウレンソウ、キウイともに 45℃付近で高い活性を示した。また、pH 4.0～9.0 の範囲で pH 依存性についても検討すると、ホウレンソウでは pH の上昇にともない活性が高くなる一方で、キウイでは pH 5.0 および pH 8.0 に高い活性が認められた。低 pH 域ではクロロフィルのフェオフィチン化が起こることから、キウイ粗酵素を用いた反応では PPH が pH 5.0 で、CLH が pH 8.0 でそれぞれ活性を示したと推察された。これらの結果から、植物種の違いにより CLH や PPH の特徴が異なることが明らかになった。

Phytol is an acyclic diterpene alcohol, released from chlorophyll and pheophytin catalyzed by chlorophyllase (CLH) and pheophytinase (PPH), respectively. Although it has been reported that the oral administration of phytol shows anti-obesity and antidiabetic effects in animal studies, little is known about phytol contents and the CLH and PPH activities in plant foodstuffs. Thus, we measured phytol contents in commercially available vegetable juices as well as spinach and green kiwi. Furthermore, we measured the CLH and PPH activities using crude enzymes extracted from those fresh green vegetable and fruit.

phytol, spinach, kiwi

発表責任者：奈良井朝子（a-narai@nvlu.ac.jp）

講演番号：3E03-11
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:00～ ミーティングルーム E

プラセンタエキスの摂取がヒト皮膚のバリア機能に及ぼす効果

Effect of placenta extract on barrier function of human skin

○座間 悠次[1]、宮下 忠士[2]、関口 聡[2]、山浦 信明[2]、影山 将克[2]、丹羽 光一[1]([1]東京農大食品香粧、[2](株) DHC)
○Yuji Zama[1], Tadashi Miyashita[2], Satoru Sekiguchi[2], Nobuaki Yamaura[2], Masakatsu Kageyama[2], Koichi Niwa[1] ([1]Tokyo Univ. Agricult., [2]DHC Corp.)

プラセンタ（胎盤）から抽出したプラセンタエキス（PE）は、健康食品や化粧品素材として利用されており、PE の経口摂取には、免疫機能の増強、更年期症状の緩和などの効果があることが知られている。一方、皮膚に対する効果として、PE の経口摂取がヒト皮膚の水分量を増加させることが報告されているが、皮膚特性に及ぼす影響は十分に明らかとなっていない。

本研究では、PE の経口摂取がヒトの皮膚特性に及ぼす効果を詳しく検証するため、皮膚のバリア機能に及ぼす影響を調べた。20 代女性に直径 5 mm の丸薬状の豚プラセンタエキス（PPE）配合サプリメントあるいはプラセボを一日 10 粒（PPE 250 mg 相当）、6 週間摂取してもらい、その間 2 週間ごとに右前腕部の角化細胞重層度、細胞面積、水分量、水分蒸散量および pH を測定した。試験は二重盲検法で行った。角化細胞のターンオーバーの指標である細胞重層度は、試験期間を通じてプラセンタ摂取群のほうがプラセボ摂取群に比べて小さく、2 週目では有意に小さかった。水分蒸散量も、試験期間中を通じてプラセンタ摂取群のほうが有意ではないが小さいままで推移した。細胞面積、水分量、および pH は両群間で差は認められなかった。

本研究結果から、PPE の経口摂取は皮膚角化細胞のターンオーバーを良好な状態に保つことで皮膚のバリア機能を増強することが示唆された。今後はさらなる長期摂取の効果を検証することが必要であろう。

The aim of this study was to clarify the influence of oral intake of porcine placenta extract (PPE) on barrier functions of human skin. In this randomized, double-blind, placebo-controlled study, ten healthy women in their 20s were divided into a PPE group (n=5) and a placebo group (n=5). PPE (250 mg) or placebo was administered to the subjects for 6 weeks. Keratinocyte stratification, cell area, water content, transepidermal water loss (TEWL) and pH of the right forearm were measured every 2 weeks. The cell stratification, which is an index of keratinocyte turnover, was smaller in the PPE group than in the placebo group throughout the test period, and significant difference was observed at the second week. The amount of TEWL also remained small in the PPE group, although it was not significant, throughout the study period. There were no differences in cell area, water content, and pH between the two groups. These results suggest that oral ingestion of PPE enhances the barrier function of the skin by affecting the turnover of keratinocytes.

Placenta extract, Transepidermal water loss, Keratinocyte turnover

発表責任者：丹羽光一（k3niwa@nodai.ac.jp）

講演番号：3E03-12
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:00～ ミーティングルーム E

アセロラがもたらすヒト腸内細菌叢への影響の *in vitro* 評価試験

In vitro evaluation of the effect of acerola on human gut microbiota

○山内 洋輔[1]、森 友花[1]、ハルタント テナギ[1]、萩原 俊彦[2]、内田 絵理子[2]、小泉 雄史[2]、福田 真嗣[1,3,4,5]（[1]株式会社メタジェン、[2]株式会社ニチレイ 技術戦略企画部、[3]慶應義塾大学先端生命科学研究所、[4]神奈川県立産業技術総合研究所、[5]筑波大学医学医療系）
○ Yohsuke YAMAUCHI[1], Yuka MORI[1], Tenagy Hartanto[1], Toshihiko HAGIWARA[2], Eriko UCHIDA[2], Takeshi KOIZUMI[2], Shinji FUKUDA[1,3,4,5] ([1]Metabologenomics, Inc., [2]Nichirei Corporation, [3]Keio Univ., [4]Kanagawa Institute of Industrial Science and Technology, [5]Tsukuba Univ.)

アセロラ（*Malpihia emarginata* DC.）にはアスコルビン酸やポリフェノールなどの機能性成分が含まれており、血糖値上昇抑制作用や抗肥満作用、美白作用といった健康効果が報告されているが、アセロラがヒト腸内細菌叢に与える影響については不明である。そこで本研究では、アセロラ果実粉末およびアセロラ果汁がヒト腸内細菌叢にどのような影響を与えるかについて、ヒト腸内細菌叢を用いた *in vitro* ハイスループット評価系 MGScreening™ を用いて解析を行った。具体的には、6 名の健常者から採取した便を培地に懸濁し、アセロラの果実粉末または果汁を添加して嫌気培養を実施した。培養後、培養液から遺伝子および代謝物質の抽出を行い、16S rRNA 遺伝子配列を用いたマイクロバイオーム解析および有機酸・胆汁酸のターゲットメタボローム解析を実施した。

その結果、アセロラ果実粉末添加群およびアセロラ果汁添加群は対照群と比較して、両群で *Blautia* 属細菌、酢酸およびコハク酸が有意に増加し、*Bilophila* 属細菌が有意に減少した。また、アセロラ果実粉末添加群において *Bifidobacterium* 属細菌、*Faecalibacterium* 属細菌、酪酸が対照群と比較して有意に増加し、アセロラ果汁添加群では *Prevotella* 9 属細菌が有意に増加した。これらの結果から、アセロラ果実粉末おアセロラ果汁がヒト腸内細菌叢に影響を与え得る可能性が示唆された。特に酢酸や酪酸などの短鎖脂肪酸量の増加は、肥満予防や免疫賦活、炎症抑制など様々な健康効果と関連することが知られていることから、アセロラの健康効果として腸内細菌叢を介して発揮される効果がある可能性が示唆された。

The Acerola (*Malpihia emarginata* DC.) is rich in functional nutrient which provide various health benefits such as glucose tolerance improvement and anti-obesity effects. However, the effect of Acerola consumption on gut environment is remain unclear. In this study, the effect of Acerola powder and juice on gut microbiota were investigated with the *in vitro* colonic microbiota model MGScreening™. Stool samples obtained from 6 healthy volunteers were independently cultured in anaerobic condition with and without Acerola-derived materials, then microbiota (16S rRNA genes) and metabolites (organic acids and bile acids) profiles were compared.

Addition of either Acerola powder or juice significantly increased the abundance of genus *Blautia* and concentration of acetate and succinate, while decreased the abundance of *Bilophila*. Moreover, addition of powder and juice respectively induced different effects. Increase in level of short-chain fatty acids observed in the study suggested the possibility that beneficial effects of Acerola are mediated by gut microbiota.

acerola, human gut microbiota, SCFA

発表責任者：山内 洋輔（yohsuke.yamauchi@metagen.co.jp）

講演番号：3E05-01
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 11:00～ ミーティングルーム E

共役リノール酸による低酸素条件下での脂肪細胞の尿酸産生抑制効果

Conjugated linoleic acid suppresses uric acid production in adipocytes under hypoxic conditions

○岩瀬 大夢[1]、小川 健二郎[2]、西山 和夫[1]、山﨑 正夫[1]([1]宮崎大農、[2]宮崎大 TT 推進機構)
○Hiromu Iwase[1], Kenjiro Ogawa[2], Kazuo Nishiyama[1], Masao Yamasaki[1] ([1]Univ. of Miyazaki, [2]Univ. of Miyazaki TT office)

生活習慣病の 1 種である痛風の発症は、高尿酸血症が要因であり、肥満との関連も強い。脂肪組織はプリン体代謝器官の 1 つであるが、肥満による脂肪組織の肥大は、低酸素応答を誘導することが知られている。本研究室では、脂肪酸の 1 種である共役リノール酸（CLA）は肝細胞において、低酸素条件下で Hypoxia Inducible Factor-1α（HIF-1α）の発現を阻害し、低酸素応答を抑制することを報告している。そこで、低酸素条件下での脂肪細胞の尿酸産生と CLA の影響について検討した。

3T3-L1 細胞を 24-well plate に 2.0×10^4 cells/cm^2 で播種し、2 日後に脂肪細胞へ常法で分化誘導を行い、6 日後にサンプルとしてリノール酸（LA）と共役リノール酸（CLA）を添加した。24 時間後に、通常酸素濃度群（20%）と低酸素処理群（1%）に分け、24 時間培養後、培地中の尿酸値を HPLC で測定した。その結果、培地中の尿酸濃度は通常酸素濃度群と比べて、低酸素処理群で有意に増加した。また、低酸素処理による尿酸値の増加に対して、LA および 9*c*,11*t* CLA を添加した群では、有意な差は認められなかった。しかし、10*t*,12*c* CLA を 200 μM 添加した群において有意に抑制された。

以上のことから、10*t*,12*c* CLA は低酸素応答による尿酸産生亢進を抑制することが示唆された。

Gout, a kind of lifestyle disease, is caused by the hyperuricemia, and is related closely to obesity. Adipose tissue is one of purine metabolic organs, and it has been revealed that the enlargement of adipocytes elicited by obesity induced hypoxic cellular response. In our laboratory, we have revealed that conjugated linoleic acid (CLA) has been reported to inhibit the expression of HIF-1α under hypoxic conditions and suppressed the hypoxic response in hepatocytes. Therefore, we investigated the effects of CLA on the uric acid production from adipocyte under hypoxic condition.

As a result, hypoxia significantly increased the production of the uric acid level into the medium. LA and 9*c*, 11*t* CLA failed to prevent the increase of uric acid production under hypoxic condition. However, 10*t*, 12*c* CLA significantly suppressed the increase of uric acid production.

In conclusion, it was suggested that 10*t*, 12*c* CLA in capable of suppressing the promotion of uric acid production under hypoxic condition.

uric acid, hipoxia, fatty acid

講演番号：3E05-02
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 11:00～ ミーティングルーム E

Beneficial Effects of Teasperin Isolated from Microbial-Fermented Tea on Cultured Adipocytes

○Chin LEE, Tenrin ANDO, Shigeki YOSHIDA, Hitoshi MIYAZAKI (Tsukuba Univ.)

【Object】Various novel polyphenol derivatives have been identified from post-fermented teas. Teadenol and teasperin are the products of tea (*Camellia sinensis* L.) leaves selectively fermented with *Aspergillus* sp. (PK-1). Although teadenol was demonstrated to show anti-obesity effect, there is no information on teasperin functions except that it stimulates NO production in vascular endothelial cells. Here, we examined the beneficial effects of teasperin on the differentiation of preadipocytes, mature adipocytes, and the hypertrophy of adipocytes using 3T3-L1 cells.

【Methods】Two days after 3T3-L1 preadipocytes reached 100% confluence (day 0), the medium was changed to the differentiation medium. Cells were cultured with 10 μM teasperin from day 2 to day 8 (differentiation stage), from day 10 to day 11 (mature stage), and from day 12 to day 18 (hypertrophy stage), respectively. After the treatments, cell lysates were prepared and subjected to western blotting to detect the expression of proteins involved in adipocyte differentiation and functions, and to Oil Red O staining to detect lipid accumulation.

【Results】During the differentiation period of 3T3-L1 cells, 10 μM teasperin showed 1.2- to 1.5-fold increases in the protein expression of the adipogenic marker genes such as glucose transporter type 4, adiponectin, adipose triglyceride lipase (ATGL), and peroxisome proliferator-activated receptor γ. Teasperin at 10 μM elevated the protein level of adiponectin and ATGL to 1.6 and 1.4 fold, respectively, in matured adipocytes.

【Conclusion】Our results suggest that teasperin, one of the products from post-fermented teas, stimulates adipocyte differentiation with the increased expression of adiponectin. Therefore, teasperin may be effective in preventing metabolic syndrome because adiponectin acts as an anti-diabetic and anti-atherogenic adipokine.

Teasperin, 3T3-L1, Adiponectin

講演番号：3E05-03
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 11:00～ ミーティングルーム E

アミノ酸混合物と運動の併用による褐色脂肪細胞化の誘導とその機構解明

Combination of exercise and intake of amino acid mixture induces brown-like adipocyte formation in mice

○江崎 菜々、小島 拓也、津田 孝範（中部大・応生）
○Nana Esaki, Takuya Kojima, Takanori Tsuda (Chubu Univ.)

【目的】運動には様々な恩恵があることが知られているが、アラニン、アルギニン、フェニルアラニンからなるアミノ酸混合物（ARF）の摂取と運動との併用は体脂肪蓄積を抑制することが報告されている[1,2]。本研究では、ARF と運動との併用によるこの効果を褐色脂肪細胞化誘導の点から検討することを目的とした。
【方法】実験動物としては C57BL/6J マウスを用い、ARF の投与と運動負荷の併用を 4 週間行い、各種脂肪組織を得た。得られた脂肪組織については、褐色脂肪細胞化に伴う形態変化、UCP1 タンパク質の発現量から褐色脂肪細胞化誘導を評価した。
【結果】 ARF のみ、運動負荷のみでは、皮下白色脂肪組織の形態変化は観察されず、UCP1 タンパク質発現の有意な誘導は認められなかった。一方、ARF 投与と運動負荷を併用すると、皮下白色脂肪組織において褐色脂肪細胞化で観察される多房化形成や UCP1 陽性の細胞が認められ、UCP1 タンパク質の発現量は有意に上昇した。この誘導機構の解明のため、血漿のメタボローム解析を試みたところ、血漿乳酸濃度は併用群で有意に上昇しており、さらに皮下白色脂肪組織の乳酸脱水素酵素 B の発現量は有意に上昇した。以上のことから乳酸を介する褐色細胞化誘導の機構[3]が働いているのではないかと考えられたので、現在さらに詳細な検討を進めている。

[1] *Diabetes Metab. Syndr. Obes.* 11, 23-33 (2018)., [2] *Jpn. Pharmacol. Ther.* 45, 1289-1294 (2017)., [3] *Diabetes* 63, 3253-3265 (2014).

Exercise is an effective strategy for managing body weight and improves overall metabolic health. In combination with dietary factors, exercise may significantly increase energy expenditure and suppress accumulation of body fat. In this study, we demonstrate that intake of an amino acid mixture containing alanine, arginine, and phenylalanine (ARF) combined with exercise significantly induced brown-like adipocyte formation in inguinal white adipose tissue (iWAT) in mice, whereas administration of ARF or exercise alone did not. Moreover, administration of ARF combined with exercise significantly increased plasma lactate concentration. This increase accompanied by a significant upregulation of lactate dehydrogenase B in iWAT. These findings demonstrate the unique effect of ARF combined with exercise for inducing brown-like adipocyte formation, which may be associated with the suggested lactate-mediated pathway.

amino acid mixture, exercise, brown-like adipocyte

発表責任者：津田孝範（tsudat@isc.chubu.ac.jp）

講演番号：3E05-04
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 11:00～ ミーティングルーム E

白色脂肪組織の glycerol kinase は細胞内脂肪酸代謝調節を介して褐色化を制御する
Glycerol kinase in white adipose tissue governs browning via the regulation of intracellular fatty acid metabolism

○後藤 剛[1,2]、岩瀬 麻里[1]、常盤 颯志[1]、瀬尾 茂人[3]、向井 貴子[4]、高橋 春弥[1]、野村 亘[1,2]、Jheng Huei-Fen[1]、松村 成暢[1]、楠堂 達也[4]、大里 直樹[3]、松田 秀雄[3]、井上 和生[1,2]、河田 照雄[1,2] ([1]京大院　農、[2]京大　C-PIER、[3]阪大　情報　、[4]帝塚山学院大　人間科学)
○ Tsuyoshi Goto[1,2], Mari Iwase[1], Soshi Tokiwa[1], Takako Mukai[3], Takako Mukai[4], Haruya Takahashi[1], Wataru Nomura[1,2], Huei-Fen Jheng[1], Shigenobu Matsumura[1], Tatsuya Kusudo[4], Naoki Osato[3], Hideo Matsuda[3], Kazuo Inoue[1,2], Teruo Kawada[1,2] ([1]Grad Sch. of Agricul., Kyoto Univ., [2]C-PIER, Kyoto Univ., [3]Grad. Sch. of Inform. Sci. and Tech., Osaka Univ., [4]Hum. Sci., Tezukayama Gakuin Univ.)

【背景・目的】寒冷刺激に代表される特定刺激に応じて white adipose tissue (WAT) 中にベージュ脂肪細胞が出現する現象は「褐色化」と呼ばれる。ベージュ脂肪細胞は褐色脂肪細胞と同様に uncoupling protein 1 (UCP1) を高発現し、高い熱産生能を示す。本研究では、白色脂肪細胞において寒冷刺激時に発現誘導される glycerol kinase (Gyk) の褐色化における役割を明らかにすることを目的とした。
【方法・結果】マウス inguinal WAT (iWAT) で *Gyk* 遺伝子を knockdown (KD) し、寒冷刺激を負荷したところ、*Gyk* KD により *Ucp1* 遺伝子の発現誘導が抑制され、寒冷耐性が低下傾向を示した。iWAT 由来脂肪細胞を用いて検討したところ、*Gyk* KD は β-adrenergic receptor (β-AR) シグナルを抑制し、*Ucp1* 遺伝子の発現誘導を抑制した。Gyk はグリセロール-3-リン酸の産生を担う酵素であり、グリセロール-3-リン酸は fatty acid (FA) とともにグリセロ脂質合成の基質となる。そこで、Gyk と FA 代謝の関連性について検討したところ、β-AR 刺激下での *Gyk* KD により stearoyl CoA desaturase 1 (*Scd1*) の発現亢進に伴う細胞内遊離一価不飽和脂肪酸量の増加が認められた。SCD1 阻害剤処理は *Gyk* KD による *Ucp1* 遺伝子の発現誘導の抑制を解除し、palmitoleic acid (POA, 一価不飽和脂肪酸) 処理により、β-AR 刺激による *Ucp1* 発現誘導が抑制されることが明らかになった。さらに、POA は phosphodiesterase (PDE) 活性を上昇させ、cAMP 分解を惹起することで、β-AR シグナルを抑制することが明らかになった。
【結論】寒冷刺激による *Gyk* 発現上昇は *Scd1* 発現を介して β-AR シグナルを調節することで褐色化に重要な役割を担うことが明らかとなり、POA が新規の褐色化制御因子であることが示唆された。

In this study, we investigated the role of Gyk in the regulation of thermogenic adipocytes function because *Gyk* expression is clearly upregulated during cold exposure. *Gyk* KD in iWAT in mice suppressed cold-induced browning, leading to the cold intolerance. In iWAT-derived adipocytes, *Gyk* KD suppressed β-AR signaling-stimulated *Ucp1* induction via the upregulation of *Scd1* expression. Upregulated *Scd1* induced monounsaturated FA, including POA, accumulation, and POA treatment suppressed β-AR signaling-stimulated *Ucp1* induction via the activation of PDE-mediated cAMP degradation. These findings indicated that *Gyk* upregulation during cold exposure plays an important role in the regulation of browning via the regulation of intracellular FA metabolism, and we also found that POA is one of the novel key metabolites for the regulation of browning.

beige adipocytes, obesity, fatty acid

発表責任者：後藤剛（goto.tsuyoshi.6x@kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3E05-05
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 11:00～ ミーティングルーム E

魚油の抗肥満作用メカニズムにおける UCP1 の役割について

The role of UCP1 in the anti-obesity effect of fish oil.

○中原 蓮[1]、和田 健司[2]、石川 瑛未[2]、川手 啓吾[1]、奥江 紗知子[1]、三浦 徳[3]、増澤（尾崎） 依[2]、細野 崇[1,2]、関 泰一郎[1,2,3]([1]日大院・生資科・応生科、[2]日大・生資科・生命化、[3]日大・生資科・総合研究所)

○Ren NAKAHARA[1], Kenji WADA[2], Eimi ISHIKAWA[2], Keigo KAWATE[1], SACHIKO OKUE[1], Atsushi MIURA[3], Yori OZAKI-MASUZAWA[2], Takashi HOSONO[1,2], Taiichiro SEKI[1,2,3] ([1]Nihon Univ. Grad. School, [2]Nihon Univ., [3]Nihon Univ. General Research Institute)

【背景・目的】魚油はイワシやサバなどの青魚などから採取される油であり、n-3 系多価不飽和脂肪酸を豊富に含有している。これまでに我々は、マウスにラード含有高脂肪食（LD）を給餌すると肥満が誘導されるが、魚油含有高脂肪食（FD)を給餌したマウスでは顕著な抗肥満作用が観察されること、FD を給餌したマウスでは鼠蹊部白色脂肪組織(Ing-WAT)の体熱産生タンパク質 Uncoupling protein 1 (UCP1)発現が誘導されるにもかかわらず、体温の上昇は認められないことを報告してきた。本研究では魚油の抗肥満作用における UCP1 の関与についてさらに検討を行った。

【方法】C57BL/6J マウスの腹腔内に小型体温計を移植し、22℃および UCP1 の発現が認められない 30℃下で LD または FD を給餌して飼育し、肥満の誘導を観察した。また、UCP1 欠損マウスおよび野生型マウスに LD または FD を給餌し、LD による肥満の誘導や FD の抗肥満作用について検討した。

【結果】22℃飼育で FD を給餌したマウスでは Ing-WAT の UCP1 発現が誘導されたが、30℃飼育で FD を給餌したマウスでは UCP1 の誘導は認められなかった。FD は 22℃，30℃いずれの飼育温度においても顕著な抗肥満作用を示した。一方、LD 給餌マウスでは 22℃，30℃いずれの飼育温度においても UCP1 の発現は観察されなかった。FD は 22℃， 30℃いずれの飼育温度においてもマウスの体重を増加させたが、30℃での体重増加が高い傾向を示した。FD は UCP1 欠損マウスにおいても抗肥満作用を示したが、LD は UCP1 欠損マウスの体重および白色脂肪組織重量を増加させた。

【結語】魚油の抗肥満作用には、UCP1 は関与しないことが明らかとなった。

Fish oil (FO) prepared from sardines and mackerel is rich in n-3 polyunsaturated fatty acids. We have previously reported the potent anti-obesity effect of FO. In this study, we further investigated the role of UCP1 in the anti-obesity effect of FO. C57BL/6J mice were fed on high fat diet containing lard (LD) or FO(FD) at 22 °C or 30 °C where UCP1 expression was not observed. UCP1-deficient mice were also employed to confirm the role of UCP1 in the anti-obesity effect of FO. UCP1 expression in the inguinal white adipose tissue (Ing-WAT) was induced in mice fed FD at 22 ° C, but not in the mice fed FD at 30 °C; however, FD-fed mice showed marked anti-obesity effects at both 22 °C and 30 °C. Furthermore, body weight and white adipose tissue weights increased in LD fed UCP1-deficient mice, but the anti-obesity effect of FD was also observed even in the UCP1 deficient mice. Taken together, these results indicate that UCP1 is not involved in the anti-obesity effect of fish oil.

Fish oil, Obesity, Uncoupling Protein 1

発表責任者：関泰一郎（seki.taiichirou@nihon-u.ac.jp）

講演番号：3E05-06
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 11:00～ ミーティングルーム E

アムラエキスが脂質過酸化に及ぼす影響

Effect of Amla Extract on lipid peroxidation

○小山 泰史、越中 雪乃、森 雄一郎、山元 宏貴（三基商事株式会社）
○Taishi KOYAMA, Yukino KOSHINAKA, Yuuichiro MORI, Hirotaka YAMAMOTO (MIKI Corporation)

【背景】アムラ（*Phyllanthus emblica*）はインド伝承医学アーユルヴェーダの三大果実の一つで、近年その抗酸化作用が科学的に解明されつつある。我々はこれまで、アムラ果実抽出物を含む食品の摂取により、肌の角層水分量、シミ、ならびにくすみの改善を見出している。近年シミやくすみの原因として、脂質酸化物の影響が報告されている。本試験では、アムラ果実抽出物（AE）が脂質酸化に与える影響について調べることを目的とした。

【方法と結果】リノール酸の自動酸化試験において、AE に強い脂質酸化抑制効果が認められた。また、ヒト線維芽細胞（NB1RGB）を用いた 2 種類の酸化ストレス亢進モデル（過酸化水素負荷、細胞老化）において、AE 処理はマロンジアルデヒド（MDA）の増加を抑制する作用を示した。また NB1RGB における発現遺伝子解析において、AE 処理はヘムオキシゲナーゼ、グルタチオンペルオキシダーゼなどの抗酸化酵素の発現を促進する作用を認めた。これらの結果から、アムラは自身の抗酸化力および抗酸化酵素の誘導により脂質酸化を抑制することで肌のシミ、くすみ改善に寄与する可能性が示唆された。

【Back ground】Amla is one of the most important plants in Indian traditional medicine. Many reports have been shown its physiological functions, especially related to its antioxidant activity. In previous study, we showed that Amla intake improved dermal moisture, spots and dullness in middle aged women. Recent studies reported that accumulation of lipid peroxides, caused dermal spots and dullness. In this study, we investigate the effect of amla fruit extract (AE) on lipid peroxidation using *in vitro* models.

【Methods and Results】In *in vitro* autoxidation model using linoleic acid as substrate, AE treatment significantly reduced lipid peroxides production. Next, we evaluated the effect of AE on malondialdehyde (MDA) production, using human dermal fibroblast cell (NB1RGB) model. MDA production was stimulated by H2O2 treatment or inducing senescence to NB1RGB. AE treatment significantly reduced MDA production in both H2O2-treated and senescent NB1RGB. RT-qPCR analysis revealed that AE treatment enhanced heme oxygenase 1 and glutathione peroxidase expressions. These results suggested that amla extract suppressed lipid peroxides production by its own antioxidant activity or inducing antioxidant enzyme, which may contribute to improving dermal spots and dullness.

Amla, lipid peroxidation, antioxidant

講演番号：3E05-07
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 11:00～ ミーティングルーム E

ナマコ摂取による皮膚光老化抑制作用の評価

Preventive effects of dietary sea cucumber on UVA-induced photoaging

○LIU SHUYU[1]、盧 翌[2]、黒野 昌洋[2]、又平 芳春[2]、真鍋 祐樹[1]、菅原 達也[1]([1]京大院農・応用生物、[2]三生医薬株式会社)
○Shuyu LIU[1], Yi LU[2], Masahiro KURONO[2], Yoshiharu MATAHIRA[2], Yuki MANABE[1], Tatuya SUGAWARA[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Sunsho Pharmaceutical Co.)

【背景･目的】紫外線によって引き起こされる深いシワや弛みなどの皮膚の変化は光老化現象として注目されている。ナマコには、皮膚への効果が期待されているコラーゲンが豊富に含まれている。そこで本研究では、ナマコ乾燥粉末またはその酵素分解物の経口摂取が UVA 照射による光老化モデルマウスに与える影響を評価した。
【方法】ヘアレスマウス（Hos:HR-1）に週 5 回の UVA 照射（20 J/cm^2/day）を 10 週間行った。飼料として AIN-93G を自由摂食させ、試験群にはナマコ乾燥粉末またはその酵素分解物を 5%配合した。経時的に背部皮膚の経皮水分蒸散量と角層水分量を測定した。また、背部皮膚レプリカを採取し、三次元画像解析により、シワの形成を定量した。10 週間後にマウスから採取した皮膚の組織切片を作製し、表皮の肥厚化を評価した。さらに、定量的 RT-PCR 法によって、皮膚バリア機能に関する mRNA 発現量の変化を解析した。
【結果･考察】UVA 照射 8 週間以降、ナマコ酵素分解物の経口投与により、シワ形成が抑制され、ナマコ乾燥粉末よりも経皮水分蒸散量の増加が有意に抑制された。また、UVA 照射による表皮の肥厚化もナマコ酵素分解物の経口摂取によって抑制された。さらに、UVA 照射による AQP3、MMP13、TNF-α の mRNA 発現増加がナマコ乾燥粉末及びその酵素分解物の経口摂取によって有意に抑制された。以上の結果から、ナマコ酵素分解物の摂取は光老化を抑制することが示された。

Chronic exposure to UV radiation causes skin photoaging, which is clinically characterized by dryness, laxity and wrinkling, having aroused the great attention of the public. In this study, we evaluated the anti-photoaging effects of sea cucumber, whose body wall contains a high level of collagen. Hairless Hos:HR-1 mice were exposed to a dose of 20 J/cm^2 five times weekly for 10 weeks, with a diet of AIN-93G containing 5% sea cucumber powder or its hydrolysate. Dorsal skin was replicated every four weeks. After 10 weeks, the mice were sacrificed, and dorsal skin specimens were collected for morphological as well as mRNA analysis.

After 8 weeks, a significant increase in TEWL by UVA was observed, while supplement of sea cucumber hydrolysate(SCH) significantly suppressed this phenomenon. Besides, epidermis from dorsal skin was distinguishably thinner in mice fed with SCH than those that were not. Meanwhile, dietary SCH significantly inhibited the induction of *AQP3, MMP13,TNF-α* expression induced by UVA exposure. Taken together, our results indicate the protective effects of dietary SCH against UVA induced photoaging.

sea cucumber, anti-photoaging, skin barrier function

講演番号：3E05-08
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 11:00～ ミーティングルーム E

酸化ストレスおよび肝障害下のヒト肝ガン由来細胞株 HepG2 に対するポリフェノールの効果

Effects of polyphenols on oxidative stress and injury in HepG2 human hepatoma cell

○森 淳輝、山田 康枝（近畿大院）
○Junki MORI, Yasue YAMADA (Kindai Univ.)

ポリフェノールは，野菜，果物などに含まれており，フリーラジカルの除去，脂質酸化の阻害などの抗酸化能を持っていることで知られている．そのポリフェノール類を用いて，ストレス物質として過酸化水素（H_2O_2）およびアセトアミノフェン（APAP）を添加した肝癌由来細胞株 HepG2 に対して MTT assay を行い，細胞保護効果を調べた．今回は，漢方薬の成分で肝臓保護効果のあるバイカリン，ラジカル消去活性を持つことで活性酸素（ROS）を除去するレスベラトロール，胆汁の分泌を促進し，肝臓の機能を活性化する効能があるクルクミン，抗酸化作用で知られるケルセチンを細胞保護物質として用いた．

H_2O_2 によって傷害された HepG2 に対しては，バイカリン，レスベラトロール，ケルセチンで細胞保護効果を示し，クルクミンでは示さなかった．また，APAP によって傷害された HepG2 に対しては，レスベラトロール 1 μM で高い細胞保護効果を示し，バイカリン，ケルセチンでは僅かに細胞保護効果を示した．クルクミンは H_2O_2 と同じく細胞保護効果を示さなかった．今回は様々なポリフェノールで保護効果を観察したが，成分によってもストレスの状態によっても保護効果が異なることが示された．

Polyphenols, which have antioxidant properties such as removal of free radicals and prevention of lipid oxidation, are contained in fruits and vegetables. The protective effects of various polyphenols on hepatocellular carcinoma cell line HepG2 treated with H_2O_2 and acetaminophen (APAP), which are known to cause liver injury, were examined. In this study, baicalin, which is a component of chinese medicine and has a protection activity of liver, resveratrol, which removes reactive oxygen species (ROS) by its radical scavenging activity, curcumin, which is effective in promoting bile secretion and activating liver function, and quercetin, which is known for its antioxidant effects, were used. The protective effects of baicalin, resveratrol, and quercetin on HepG2 injured by H2O2 were observed. In addition, 1 μM resveratrol showed a high protective effect on HepG2 injured by APAP, while baicalin and quercetin showed slight protective effects. Curcumin showed no protective effect against H2O2 and APAP. However, the protective effects of polyphenols changed depending on the ingredients and stress conditions.

HepG2, Polyphenol, Acetaminophen

講演番号：3E05-09
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 11:00～ ミーティングルーム E

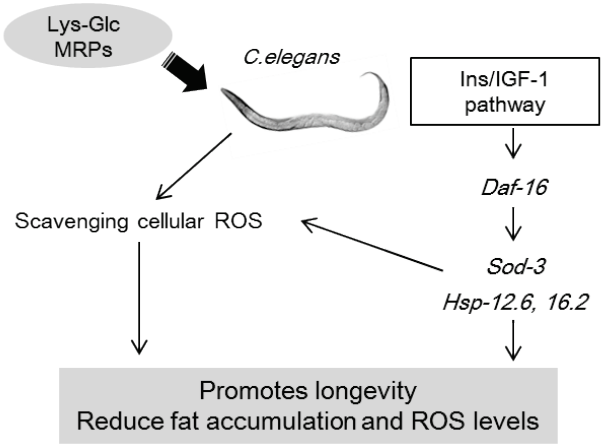
Lys-Glc メイラード反応生成物が線虫（*C.elegans*）の寿命に及ぼす影響

Effect of Lys-Glc Maillard reaction products on lifespan in *C.elegans*

○横山 壱成[1]、瀬戸山 央[2]、小宮 佑介[1]、長竿 淳[1]、有原 圭三[1]([1]北里大獣、[2]（地独）神奈川県立産技総研)
○Issei YOKOYAMA[1], Ou SETOYAMA[2], Yusuke KOMIYA[1], Jun NAGASAO[1], Keizo ARIHARA[1]
([1]Kitasato Univ., [2]Kanagawa Institute of Industrial Science and Technology)

食品の加熱調理・加工時に起こるメイラード反応では多くの化合物が生成される。これらの中には、メラノイジンのような抗酸化物質も含まれる。抗酸化物質の効果のひとつに、アンチエイジング作用がある。メイラード反応生成物にもアンチエイジング作用が期待されるが、これまでにこの種の報告は見られない。アンチエイジング作用の検討には、線虫（*C.elegans*）の寿命を指標とした実験系が利用されており、抗酸化物質の投与により寿命が延長することが報告されている。本研究では、線虫を用いてメイラード反応生成物が寿命に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

リジンとグルコースを混合し、加熱しないもの（未反応）あるいは 90℃で 120 分間加熱したもの（反応物）を使用し、線虫（N_2 株）に投与した。反応物を投与した線虫の寿命は、対照区と比較して約 20%延長することが明らかになった。また、反応物の投与により、熱ストレス（35℃・4h）に対する抵抗性が大きく向上することが明らかとなった。さらに、インスリン/IGF-1 シグナル伝達経路において寿命延長に寄与する *Daf-16* やその標的遺伝子の発現が上昇することが判明した。



The Maillard reaction generates many chemical compounds including antioxidants such as melanoidin. One of the properties of antioxidants is their anti-aging effect. *C.elegans* is a popular model in aging research and its lifespan is prolonged by antioxidants. In this study, we investigated the effect of Lys-Glc Maillard reaction products (MRPs) on lifespan of *C. elegans*. The results of the conducted analysis showed that Lys-Glc MRPs prolonged lifespan and reduced fat accumulation and cellular ROS. Moreover, the heat stress tolerance of *C.elegans* was improved by Lys-Glc MRPs. Furthermore, the expression of *Daf-16* and its target genes in the insulin/IGF-1 signaling pathway were up-regulated, suggesting that contributes significantly to lifespan extension. These results indicate that Lys-Glc MRPs improve the resistance to heat stress, and contribute to longevity via the insulin/IGF-1 signaling pathway.

Maillard reaction, *C.elegans*, Anti-aging effect

発表責任者：有原圭三（arihara@vmas.kitasato-u.ac.jp）

講演番号：3E05-10
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 11:00～ ミーティングルーム E

ケルセチンのプレニル化による抗酸化特性の変化

Prenylation alters the antioxidant properties of quercetin

○吉田 真生[1]、田井 章博[2]、向井 理恵[2] ([1]徳島大・生物、[2]徳島大学院・社会産業理工)
○MASAKI YOSHIDA[1], AKIHIRO TAI[2], RIE MUKAI[2] ([1]Fac. Biosci. Bioindust., Tokushima Univ., [2]Grad. Sch. Technol. Industrial and Soc. Sci., Tokushima Univ.)

【目的】ケルセチン（Q）は抗酸化作用などの生理活性を持つフラボノイドである。これまでに、フラボノイドにプレニル基が付加することで、生理活性が強くなる例が報告されている。このことから Q のプレニル化によって抗酸化作用が強くなると仮定した。本研究では Q の 5′位、6 位あるいは 8 位にプレニル基修飾した 3 種類のプレニルケルセチン（PQ）を用いることとした。これらの PQ と、母骨格である Q とを比較評価することで、プレニル化によって Q の抗酸化作用が増強するか否か明らかにすることを目的とし、研究を行った。
【方法・結果】まず、ABTS ラジカル除去活性を評価した。その結果、8-PQ ならびに 6-PQ は Q と比べてラジカル消去活性が高くなった。一方で、5′-PQ は Q よりも低かった。次に AAPH 誘導性酸化的赤血球溶血に対する保護作用を OxHLIA 法で評価した。いずれの物質も酸化的溶血に対する保護作用を示し、作用の強さは 5'-PQ>Q≈8-PQ>6-PQ という順であった。 これらの違いの要因を明らかにするため、Q と各 PQ の赤血球への分配について、HPLC 分析を用いて解析した。Q と比較して、いずれの PQ も赤血球への分配が多い傾向が認められた。PQ の赤血球溶血保護作用と分配性との相関は検討課題である。以上の結果から、Q に対するプレニル基修飾は、抗酸化活性を増強する場合があることが分かった。また、その増強効果はプレニル基の結合位置によって異なり、また抗酸化評価系によっても異なることが明らかとなった。

Quercetin (Q) is one of the flavonoids that possess anti-oxidative activity. It has been reported that prenylation to flavonoids enhances physiological activity. Taken together, we hypothesized that the prenylation of Q would enhance the antioxidant activity. We applied three types of prenyl quercetin (PQ) modified with a prenyl group at the 5', 6, or 8 positions of Q in this study. This study aims to clarify whether prenylation enhances the anti-oxidative activity of Q or not.

As a result, 8-PQ and 6-PQ had higher ABTS radical scavenging activity than Q. The protective effect against AAPH-induced oxidative erythrocyte hemolysis was evaluated by the OxHLIA method. The strength of the effect was in the order of 5'-PQ> Q ≈ 8-PQ> 6-PQ. We analyzed the distribution of Q and each PQ to erythrocytes by HPLC. All PQs showed higher distribution than Q, however, there were no differences among each PQs. It was clarified that the enhancing effect on anti-oxidative activity differs depending on the binding position of the phenyl group to Q and also depends on the antioxidant evaluation methods.

prenylation, antioxidants, quercetin

講演番号：3E05-11
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 11:00～ ミーティングルーム E

複合プロバイオティクスが腸内環境に与える影響

The effects of mixed probiotics on the intestinal environment.

○山口 大貴[1]、金谷 忠[1]、河野 麻実子[1]、川上 宏智[1]、稲垣 瑞穂[2] ([1]森下仁丹株式会社　ヘルスケア事業本部　ヘルスケア研究開発部、[2]岐阜大・応用生物)
○Taiki YAMAGUCHI[1], Tadashi KANAYA[1], Mamiko KOHNO[1], Hirosato KAWAKAMI[1], Mizuho INAGAKI[2] ([1]Morishita Jintan Co.,Ltd. Health Care Product Department, [2]Faculty of Applied Biological Sciences, Gifu University)

【目的】腸内細菌叢の多様性が近年注目されており、個々人の腸内フローラに合ったプロバイオティクスを摂取することで、より高い腸内フローラ改善効果が期待される。本研究では、ヒト糞便を用いた腸内細菌培養モデル（KUHIMM: Kobe University Human Intestinal Microbiota Model）を用いて、6 種の複合プロバイオティクス摂取が腸内 pH や有機酸産生に与える影響を明らかにし、複数菌種のプロバイオティクスを摂取することの有用性を評価することを目的とした。
【方法】便秘傾向の健常成人 6 名の糞便を用いた腸内細菌培養モデルに、*Bifidobacterium* 属 3 種、*Lactobacillus* 属 3 種の計 6 種の菌末からなる複合プロバイオティクスを添加・培養し、培養開始から経時的にサンプリングした。培養中は pH をモニタリングし、サンプリングした培養液は、主要 5 種の有機酸解析、*Bifidobacterium* 属および *Lactobacillus* 属の菌数の定量に供した。また、培養液中は pH をモニタリングし、その変動を確認した。(岐阜大学医学倫理審査委員会 承認 No. 29-382)
【結果】腸内細菌培養モデルに複合プロバイオティクスを添加することで、プロバイオティクスを添加していない腸内細菌叢培養モデルと比較して培養液中の pH の低下がみられ、乳酸の蓄積が確認された。また、複合プロバイオティクス中の *Bifidobacterium* 属の菌数を増量し培養した場合、6 名中 2 名で更なる pH 低下が確認された。
【結論】複合プロバイオティクスを摂取することで、腸内 pH を低下させ、腸内フローラを改善することが期待された。また、*Bifidobacterium* 属を増菌させた場合の整腸作用の適合性には個人差があることが示唆された。

【Purpose】To investigate the effects of mixed probiotics on the intestinal environment.
【Method】Fecal samples were cultivated with mixed probiotics, 3 *Bifidobacterium* species and 3 *Lactobacillus* species, in KUHIMM (Kobe University Human Intestinal Microbiota Model) to investigate the effects of these mixed probiotics based on the pH of cultures and amounts of short-chain fatty acids .
【Result】The pH of the cultures in the presence of mixed probiotics was lower than in the absence of mixed probiotics.
【Conclusion】Mixed probiotics have beneficial effects on human intestinal function.

Probiotics, Gut microbiota, Human Intestinal Model

講演番号：3E05-12
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 11:00～ ミーティングルーム E

幼若期における咀嚼刺激が記憶に与える影響

Effects of mastication on memory in young rat

○李 善美[1]、安岡 顕人[2]、永井 俊匡[3]、斎藤 芳和[1]、阿部 啓子[1,4]、朝倉 富子[1] ([1]東大院農生科、[2]聖徳大・人間栄養、[3]高崎健大・健康栄養、[4]神奈川県立産業技術総合研究所)
○Sonmi LI[1], Akihito YASUOKA[2], Toshitada NAGAI[3], Yoshikazu SAITOU[1], Keiko ABE[1,4], Tomiko ASAKURA[1] ([1]Univ. of Tokyo, [2]Seitoku Univ., [3]Takasaki Univ. of Health and Welfare, [4]Kanagawa Institute of Industrial Science and Technology)

【背景・目的】食生活の変化に伴い、現代人の咀嚼頻度は低下しつつある。咀嚼に関する研究の多くは成熟期から老齢期に注目して行われてきており、咀嚼頻度が脳の活性化や記憶力の維持に重要であることが明らかになっている。一方、離乳期での研究は少ない。昨年度までに我々は、離乳直後のラットを粉末餌あるいは固形餌で飼育し、海馬を中心に解析を行った。その結果、固形餌群において樹状突起形成を制御する遺伝子の活性化と神経樹状突起の発達が観察された。本年度はこのラットの行動を解析した。
【方法・結果】3 週齢(離乳直後)の Wistar 系雄ラットに粉末餌または固形餌を与え(各群 n=5)、8 日間飼育した後、新奇物体認識試験と Y 字迷路試験を行った。その結果、固形餌群の新規物体認知機能が粉末餌群に比べ有意に高いことが確認された。Y 字迷路試験では、短期作業記憶の指標である交替行動率が固形餌群で有意に高かった。以上より、若年期における咀嚼が記憶機能の発達に影響を与える可能性が示唆された。

【Background・Purpose】It has been shown that mastication motion is necessary for the maintenance of brain activity and memory especially during adult to old age. However, few study focused on weaning period. We have analyzed hippocampal transcriptome and morphology in the young rats fed with powdered or solid diet. The rats in solid diet group showed significant upregulation of the genes related to dendrite growth and morphological change of the dendrites. In this study, we aimed to analyze behavioral outcome of this neuronal change.

【Method・Result】 Three-week-old Wistar male rats were fed solid or powdered diet for 8 days and subjected to novel object recognition test and Y-maze test. The rats in solid diet group showed higher rate of novel object recognition, and higher alternation ratio in Y-maze, both of which reflect the animals' ability to hold memory. These results suggested that mastication in weaning period facilitate development of memory function of the animals.

mastication, hippocampus, memory

発表責任者：朝倉富子（asakura@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3E05-13
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 11:00～ ミーティングルーム E

長期間の咀嚼は視床下部の遺伝子発現の変化と血圧の低下をもたらす

Long-term mastication affects hypothalamic transcriptome and blood pressure

○永井 俊匡[1]、齊藤 美佳[2]、清水 愛恵[1]、齋藤 芳和[3]、安岡 顕人[4]、阿部 啓子[3,5]、朝倉 富子[3]([1]高崎健大・健康栄養、[2]東洋大・健康栄養、[3]東大院農生科、[4]聖徳大・人間栄養、[5]神奈川県立産業技術総合研究所)
○Toshitada NAGAI[1], Mika SAITO[2], Manae SHIMIZU[1], Yoshikazu SAITO[3], Akihito YASUOKA[4], Keiko ABE[3,5], Tomiko ASAKURA[3] ([1]Takasaki Univ. of Health and Welfare, [2]Toyo Univ., [3]Univ. of Tokyo, [4]Seitoku Univ., [5]Kanagawa Institute of Industrial Science and Technology)

【目的】咀嚼は単なる機械的消化作用だけではなく、様々な生理作用を持つことが明らかにされている。これまで我々は、咀嚼の脳機能に対する効果のメカニズムを解明するため、粉末飼料および固形飼料で飼育した離乳直後ラットの脳内遺伝子発現を比較した（BBRC, 2018, 498, 621）。本研究では、長期間にわたる咀嚼頻度の差がどのような影響を及ぼすかを解析した。
【方法】3 週齢 Wistar 系雄ラットに固形または粉末飼料を与えて 15 週間飼育し、最終週に血圧を測定した。GeneChip Rat Genome 230 2.0 Array (Affymetrix)を用いて視床下部の発現変動遺伝子（differentially expressed genes, DEGs）を抽出し、Gene Ontology (GO) 解析した。また ELISA 法で、副腎関連ホルモンの血中濃度を測定した。
【結果と考察】飼育最終週に測定した血圧について、固形飼料群で有意に低下した。そこで視床下部の DNA マイクロアレイ解析を行ったところ、378 個の DEGs が抽出された。GO 解析から血圧に関連する DEGs に着目すると、視床下部-下垂体-副腎系の抑制が示唆された。これらの遺伝子は、リアルタイム PCR による定量においても、その発現の変動が証明された。さらに、副腎皮質刺激ホルモンの固形飼料による血中濃度低下が明らかとなった。以上の結果から、固形飼料によって咀嚼頻度が高くなると、視床下部の遺伝子発現変動を介して、血圧が低下することが示唆された。
[Purpose] Mastication has various physiological effects. We have analyzed the transcriptomes in the brain of weaned rats to elucidate the mechanism of the effect of mastication (BBRC, 2018, 498, 621). In this study, we analyzed how long-term mastication effects on rats.
[Method] Three-week-old Wistar male rats were fed solid or powdered diets and bred for 15 weeks. Blood pressure was measured in the last week. Hypothalamic genes were analyzed with DNA microarray using GeneChip Rat Genome 230 2.0 Array (Affymetrix). Differentially expressed genes (DEGs) were extracted and analyzed by Gene Ontology (GO).
[Results and discussion] Blood pressure was significantly decreased in the solid feed group. Using DNA microarray, 378 DEGs of the hypothalamus were extracted. Focusing on the DEGs related to blood pressure with GO analysis, the hypothalamus-pituitary-adrenal axis could be suppressed by the solid diet. From the above results, it was suggested that mastication decreased blood pressure through altered transcriptome of the hypothalamus.

mastication, hypothalamus, DNA microarray

発表責任者：永井俊匡（tnagai@takasaki-u.ac.jp）

講演番号：3E05-14
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 11:00～ ミーティングルーム E

植物フィトケミカル及びその代謝物によるコロナウイルス 3CL プロテアーゼ阻害
Inhibition of SARS-CoV-2 3C-like protease by phytochemicals and its metabolites
○加藤 陽二[1,2]、焼本 千里[1]、伊藤 美紀子[1,2]、辻 一徳[3]、丹羽 利夫[4]、西川 美宇[5]、生城 真一[5]([1]兵庫県大環境人間、[2]兵庫県大先端食セ、[3]分子機能研究所、[4]修文大健康栄養、[5]富山県大工)
○Yoji Kato[1,2], Chisato Yakemoto[1], Mikiko Ito[1,2], Motonori Tsuji[3], Toshio Niwa[4], Miyu Nishikawa[5], Shinichi Ikushiro[5] ([1]Univ. Hyogo, [2]U. Hyogo RIFNS, [3]Inst. Mole. Func., [4]Shubun Univ., [5]Toyama Pref. Univ.)

【目的】本研究では食によるコロナウイルス SARS-CoV-2 制御を目指し、ウイルス酵素メインプロテアーゼ（3CL protease, 3CLpro）をその標的分子とした。植物由来の食成分フィトケミカル（フラボノイドなど）及びその代謝物を阻害成分の候補とした。

【方法】フラボノイド及びその配糖体や代謝物などを 3CLpro 酵素（組換え体）と保温し、その後、基質としてペプチド（Dabcyl-KTSAVLQSGFRKME-Edans）を添加し、切断物を蛍光プレートリーダーにより測定して活性を評価した。一部の成分については計算化学ドッキングのシミュレーションも行った。

【結果】ケルセチンやルテオリン及びその配糖体やグルクロン酸抱合体に酵素阻害活性を見出した。

【考察】アグリコンであるケルセチンやルテオリンに加え、配糖体や細胞内代謝で生じるグルクロン酸抱合体にも阻害活性が認められたことから、フィトケミカルによるウイルス酵素阻害の可能性が示唆された。現在はより直接的に酵素活性の評価を行うため、切断されたペプチドを質量分析器により定量する手法を検討しており、その結果と合わせて講演発表する。

In this study, to examine suppressive effect of food on the SARS-CoV-2 infection, we have focused on virus main protease, 3CL-protease (3CLpro), as the target. As a candidate of the inhibitor, we have chosen plant-derived food chemicals, phytochemicals, along with its glycosides and metabolites.
The recombinant 3CLpro was pre-incubated with a test sample, and Dabcyl-KTSAVLQSGFRKME-Edans was then added as a substrate. To evaluate the activity, its cleaved fluoresce product was measured by a fluorescence plate reader. In silico docking study for some chemicals was also performed. As a result, quercetin, luteolin, their glucosides, and glucuronides showed inhibitory effects on the 3CLpro.
Because glucuronidation is processed in a cell, the inhibition by the glucuronide conjugates may suggest in vivo prevention of virus replication. Currently, a mass spectrometric analysis for a cleaved peptide is tested to directly measure the enzyme activity. We are going to present these including the on-going mass spectrometric evaluation.

Phytochemical, Metabolite, 3C-like protease

発表責任者：加藤陽二（yojikato@shse.u-hyogo.ac.jp）

講演番号：3E05-15
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 11:00～ ミーティングルーム E

乳酸菌を用いた新規微生物制御発酵茶の製造

Production of microorganism-controlled fermented tea by using lactic acid bacteria

○永嶺 海夕、椎葉 究、安部 智子（電機大理工）
○Myu NAGAMINE, Kiwamu SHIIBA, Tomoko ABE (Tokyo Denki Univ.)

後発酵茶（微生物発酵茶）は苦みの少ない健康飲料として、茶離れが進んでいる若年層にも今後普及する可能性がある。後発酵茶に含まれる新規機能性成分が報告され、その効能が注目されているが、現在、日本国内において後発酵茶の生産量は少なく、国内ではほとんど流通していない。後発酵茶を製造するにあたり、我々はこれまでに食品製造に用いられている微生物を用いて発酵条件を検討し、その中から乳酸菌を選抜した。本研究では選抜した乳酸菌を用いて、二番茶を原料とした後発酵茶の製造方法を検討した。一番茶の後に摘採される二番茶や三番茶は中・下級茶扱いとなり、販売は加工する手間やコストに見合わず、その多くが廃棄されている現状にある。本研究では、国内の低価格な二・三番茶を原料として、安定した乳酸発酵技術により特徴ある後発酵茶を作り、その機能的価値を検証することを目的とした。

GYP 液体培地で前培養した乳酸菌を乾燥した茶葉と混ぜ合わせ 30℃で嫌気的に発酵後、茶葉から抽出した溶液を後発酵茶 1 とした。また、茶葉抽出液に前培養した乳酸菌を加え、30℃で嫌気的に発酵させた溶液を後発酵茶 2 とした。発酵開始から経時的に茶葉を採取して乳酸菌数と pH を測定し、発酵条件を検討した。乳酸菌を加えていない非発酵茶と比較して、乳酸菌数の増加と pH の低下を確認した。後発酵茶 1 では、抗酸化活性およびアンジオテンシン変換酵素阻害活性が確認された。マウスの後発酵茶飲用試験では、高脂肪食を摂取させたマウスに対して、体重増加抑制効果および血中コレステロール濃度の増加抑制効果が見られた。後発酵茶 1 および 2 の HPLC 分析を行った結果、発酵過程において増加、あるいは減少する成分のピークが検出された。

Post-fermented teas have been produced from tea leaves by fermentation using several microorganisms which has been almost unidentified. However, in this study using selected lactic acid bacteria only, a new post-fermented tea was produced. These physiological functions and some components were investigated. In these HPLC studies, it was detected that the amount of some components was increased during fermentation while some components decreased. Antioxidative activities and inhibitory activities against angiotensin-converting enzyme of the fermented tea were also detected. The relationship between results from constituent and physiological studies would be reported.

Fermented tea, Lactic acid bacteria

講演番号：3E06-01
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:00～ ミーティングルーム E

環状四糖（CNN）水あめの消化性および整腸作用

Digestibility and intestinal regulation function of cyclic nigerosylnigerose (CNN) starch syrup

○内田 智子、安田 亜希子、溝手 晶子、谷口 美文、尾平 優、高橋 遵、吉實 知代、石橋 真紀、森下 尚紀、遠藤 伸、三皷 仁志、山本 晃隆（株式会社 林原）
○Satoko UCHIDA, Akiko YASUDA, Akiko MIZOTE, Yoshifumi TANIGUCHI, Yu OHIRA, Jun TAKAHASHI, Chiyo YOSHIZANE, Maki ISHIBASHI, Naoki MORISHITA, Shin ENDO, Hitoshi MITSUZUMI, Koryu YAMAMOTO (Hayashibara Co., Ltd.)

【目的】我々は本大会では、食物繊維含量 76%の扱いやすい物性や程よい甘味のある CNN 水あめ開発について報告した。本水あめの主成分である CNN については難消化性であることがわかっているが [1)]、水あめについては不明である。そこで CNN 水あめの消化性、吸収性について各種試験を実施した。また食物繊維素材であることから継続摂取時の整腸作用について検討した。
【方法】試験 1. *In vitro* 消化性試験：唾液アミラーゼ、人工胃液、膵液アミラーゼ、小腸刷子縁膜小胞（brush border membrane vesicle、BBMV）を用いて CNN 水あめの消化率と糖組成の変化を解析した。試験 2. ラット経口負荷試験：Wistar rat（8 週齢、雄）を一晩絶食後、固形分として 2 g/kg-体重の CNN 水あめまたはグルコースを経口負荷した。経時的に採血し、血糖値、インスリン値を測定した。試験 3. ラット継続摂取試験：Wistar rat（8 週齢、雄）に、固形分 1、2%の CNN 水あめ水溶液または水を給水飼育した。2 週間後、盲腸内容物と糞便を回収し、各種分析をおこなった。
【結果および考察】試験 1. CNN 水あめは唾液アミラーゼ、人工胃液、膵液アミラーゼでは消化されなかった。BBMV において CNN は消化されなかったのに対し、CNN 水あめは約 4 割消化された。BBMV 消化前後を糖組成分析で比較すると CNN 構造以外の部分が消失し、CNN とグルコースに分解されていた。試験 2. CNN 水あめ負荷時の血糖値およびインスリン値はグルコースを投与した時と比べ低く推移し、上昇曲線下面積は血糖値、インスリン値ともにグルコース投与時の約 6 割であった。試験 3. 2%CNN 水あめ摂取により糞便の重量、水分含量の増加、盲腸内容物において、pH の低下、酢酸と総有機酸量の増加、IgA 量の増加が認められた。CNN 水あめは小腸において部分的に消化されグルコースとして吸収されるが、CNN については消化されず大腸に到達したと考えられる。また CNN 水あめ継続摂取により整腸作用を発揮し、さらには腸管免疫の増強作用も示唆された。

CNN starch syrup was digested about 40% by the small intestine enzyme, but CNN wasn't digested. Single intake of CNN starch syrup to a rat, the blood glucose level was rise about 60% compared to glucose intake. Increase of feces and organic acid quantity were confirmed in continuation intake of CNN starch syrup to a rat. From these results, it found that CNN starch syrup is the dietary fiber material that has sweetness, source of energy, and intestinal regulation function.

1) Hashimoto *et al.*: *J. Appl. Glycosci.*, **53**, 233-230 (2006).

cyclic nigerosylnigerose, dietary fiber, intestinal regulation function

発表責任者：内田智子（satoko.uchida@hb.nagase.co.jp）

講演番号：3E06-02
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:00～ ミーティングルーム E

環状四糖（CNN）水あめのエネルギー評価とヒト腸内発酵性

The evaluation of available energy and human intestinal fermentability of cyclic nigerosylnigerose (CNN) starch syrup

○溝手 晶子、安田 亜希子、石田 有希、吉實 知代、角田 省二、遠藤 伸、三皷 仁志、山本 晃隆（株式会社 林原）
○Akiko MIZOTE, Akiko YASUDA, Yuki ISHIDA, Chiyo YOSHIZANE, Shoji KAKUTA, Shin ENDO, Hitoshi MITSUDUMI, Koryu YAMAMOTO (Hayashibara Co., Ltd.)

【目的】前演題で環状四糖（cyclic nigerosylnigerose、CNN）水あめを摂取すると、CNN 構造以外の部分が消化され、CNN として大腸に到達する可能性が示された。本試験では、CNN の単回摂取時の腸内発酵性を調べることにより CNN 水あめのエネルギー換算値を算出するとともに、継続摂取時の腸内発酵性を調査することで腸内細菌叢へ及ぼす影響を検討した。
【方法】健常成人 13 名を対象としプラセボ対照二重盲検クロスオーバー比較法にて単回摂取試験および継続摂取試験を実施した。単回摂取試験は一晩の絶食後、固形分 5 g の CNN またはフラクトオリゴ糖（FOS）を摂取させ、摂取後 14 時間まで 1 時間毎の呼気を採集し、水素ガス濃度を測定した。継続摂取試験は単回摂取試験後 5 g の CNN または FOS を 2 週間毎日摂取し、最終日に単回摂取試験と同様に呼気を採集し経時的な呼気水素ガス濃度を測定した。
【結果および考察】単回摂取ではどの被験者においても CNN 摂取後の呼気ガスに水素はほとんど検出されず、CNN は腸内で発酵されないことが示された。難消化性で完全に腸内発酵される FOS の上昇曲線下面積（IAUC）に対し、CNN の IAUC は 12.3%であった。前演題より CNN は消化されないため、エネルギー換算値は 0 kcal/g となった。CNN 水あめのうち、CNN 構造部分 47%（本大会にて報告）以外の構造はグルコースにまで消化され吸収されることから、固形分あたりのエネルギー換算値は 2 kcal/g であった。また、CNN の継続摂取により被験者 3 名において呼気水素ガス濃度の上昇が認められた。それに伴い平均呼気水素ガス濃度も上昇し、IAUC は FOS の 36.7%であった。CNN を継続的に摂取すると腸内細菌叢が変化し、一部の CNN が資化される可能性が考えられた。
今回の一連の報告から、我々が開発した CNN 水あめは扱いやすい物性や程よい甘味から、食品応用しやすい低分子量の食物繊維素材であることが示された。また、摂取すると穏やかなエネルギー源となる一方で、継続摂取すると腸内細菌叢や免疫系に影響を与え、腸管を起点とする生理作用が期待された。

We succeeded in synthesizing CNN starch syrup efficiently through the combined reaction of enzymes. This starch syrup consists CNN as main component and had a dietary fiber content of 76%. The available energy of CNN starch syrup was calculated 2 kcal/g. CNN starch syrup to be a new dietary fiber material which has low molecular weight, easy-to-use properties and moderate sweetness.

cyclic nigerosylnigerose, dietary fiber, intestinal fermentability

発表責任者：溝手晶子（akiko.mizote@hb.nagase.co.jp）

講演番号：3E06-03
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:00～ ミーティングルーム E

環状四糖（CNN）の 摂取が高脂肪食誘導性肥満マウスのインスリン抵抗性に及ぼす影響

Effect of cyclic nigerosylnigerose (CNN) on insulin resistance in high-fat diet-induced obese mice

○鶴田 剛司[1]、溝手 晶子[3]、塩津 萌々子[2]、佐相 晴香[2]、西野 直樹[1]（[1]岡山大院環境生命、[2]岡山大農、[3]株式会社 林原）
○Takeshi TSURUTA[1], Akiko MIZOTE[3], Momoko SHIOTSU[2], Haruka SASOU[2], Naoki NISHINO[1]
([1]Okayama Univ. Env. Life Sci., [2]Okayama Univ. Agr., [3]Hayashibara Co., Ltd)

環状四糖（cyclic nigerosylnigerose、CNN）はグルコース 4 分子が環状に結合した低分子の食物繊維である。本研究では、CNN の摂取が肥満および肥満にともなって起こる腸内細菌叢の変化やインスリン感受性の低下に及ぼす影響を検証するために食餌誘導性肥満マウスへの投与実験を実施した。Balb/c マウスを対照群、高脂肪食（HFD）群、HFD＋CNN L 群、HFD＋CNN H 群の 4 群に分けた。対照群には標準食を、残りの 3 群には HFD を 20 週間給餌した。HFD＋CNN L 群および HFD＋CNN H 群には 22.5 および 45 mg/mL の CNN をそれぞれ飲水投与した。経口糖負荷試験を実施した後、解剖により血清、盲腸内容物、卵巣周囲および腸間膜脂肪組織を回収した。回収した血清を用いて空腹時血糖値および空腹時インスリン濃度を測定し、インスリン抵抗性の簡易的な指標である HOMA-IR を算出した。また、回収した盲腸内容物より細菌 DNA を抽出し、Miseq を用いた腸内細菌叢解析を実施した。体重は HFD を摂取した 3 群間で有意差がなかったが、腸間膜脂肪組織重量は HFD 群と比較して HFD＋CNN H 群で低下する傾向がみられた（P=0.08）。経口糖負荷試験の結果、血糖上昇曲線下面積は HFD 群と比較して HFD+CNN H 群で低下する傾向がみられた（P=0.08）。また、空腹時血糖値は HFD 群と比較して HFD＋CNN H 群で低下する傾向がみられ（P=0.07）、空腹時インスリン濃度および HOMA-IR は HFD 群と比較して HFD＋CNN H 群で有意に低下した。盲腸内菌叢は HFD＋CNN H 群で他の 3 群と比較して大きな変化がみられ、*Prevotella* 属、*Roseburia* 属および未分類の Lachnospiraceae の占有率は HFD＋CNN H 群で HFD 群と比較して増加がみられた。これらの結果から、CNN の摂取は肥満にともなう耐糖能およびインスリン感受性の低下を緩和することが示唆された。また、CNN は HFD 摂取下で盲腸内菌叢を変化させることが示唆された。

Cyclic nigerosylnigerose (CNN) is a cyclic and low-molecular-weight dietary fiber. In the current study, the effect of oral administration of CNN on high-fat diet (HFD)-induced obesity, alteration of gut microbiota, and decreased insulin sensitivity was evaluated by using HFD-induced obese mice. The fasting blood glucose and insulin level were measured to calculate HOMA-IR index. Pyrosequencing of bacterial 16S rRNA genes in the cecal content was conducted to evaluate the gut microbiota. As a result, CNN-administered HFD group showed a significant lower fasting blood glucose level and HOMA-IR index as compared to HFD group. Furthermore, CNN administration changed gut microbiota by increasing the relative abundance of *Prevotella*, *Roseburia*, and unclassified Lachnospiraceae as compared to HFD group.

cyclic nigerosylnigerose, dietary fiber, insulin resistance

講演番号：3E06-04
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:00～ ミーティングルーム E

エクストラバージンオリーブオイルの香りをもたらす揮発性物質の起源の解明

Elucidation of the origin of volatile compounds that contribute to fruity flavor of extra virgin olive oil

○境野 眞善[1,2]、加藤 俊治[2,3]、伊藤 隼哉[2]、竹内 茂雄[1]、今義 潤[1,3]、仲川 清隆[2,3] ([1](株)J-オイルミルズ、[2]東北大院農・機能分子解析学、[3]東北大院農・J-オイルミルズ油脂イノベーション共同研究講座)
○Masayoshi SAKAINO[1,2], Shunji KATO[2,3], Junya ITO[2], Shigeo TAKEUCHI[1], Jun IMAGI[1,3], Kiyotaka NAKAGAWA[2,3] ([1]J-OIL MILLS, INC., [2]Food and Biodynamic Chemistry Laboratory, Tohoku Univ., [3]J-Oil Mills Innovation Laboratory, Tohoku Univ.)

【目的】 エクストラバージンオリーブオイル（EVOO）のフルーティーな香りはアルデヒドやケトン等の香気成分に起因することが報告されている。これらは過酸化脂質の分解により生じるが、EVOO 中の過酸化脂質は十分に分析されていない課題がある。そこで、本研究は EVOO 中の過酸化脂質と香気成分を分析し、EVOO の香りへの影響を把握することを目的とした。今回は、測定対象とする過酸化脂質を絞り込むため、EVOO の香気成分と官能評価結果を多変量解析により比較したので報告する。
【方法】 サンプルは開封直後の EVOO を使用した。官能評価はアメリカ油化学会のオリーブオイルパネル認定を受けたパネルチームで行い、その中央値を採用した。香気成分は固相マイクロ抽出法を用いた GC-MS にて分析した。多変量解析は解析ソフト SIMCA を用いて行った。
【結果】 官能評価により選定した EVOO について、GC-MS で香気成分を分析したところ、100 以上のピークを検出することができた。次に、官能評価の点数を目的変数、香気成分を説明変数として OPLS 分析を行った結果、官能評価の点数と関連が高い物質として、1-Penten-3-one や 2-Hexenal などの 13-Hydroperoxy-octadecatrienoic acid（13-HpOTE）由来の香気成分が多く抽出できた。したがって、今後はこれらの EVOO 中の 13-HpOTE の分析を行い、フルーティーな香りへの影響の評価を予定している。

The fruity flavor of extra virgin olive oil (EVOO) is known to be attributed to the volatile compounds such as aldehydes and ketones. These compounds are speculated to be derived from cleavage of lipid hydroperoxides, but the analysis of lipid hydroperoxides in EVOO has been insufficient. Therefore, we tried to determine the relationship between the lipid hydroperoxides, the volatile compounds, and fruity flavor in EVOO.

First, we detected more than 100 volatile compounds by GC-MS analysis of EVOO selected in the sensory evaluation test by an AOCS Recognized Panel in Olive Oil Sensory Analysis. Next, we conducted the OPLS analysis with the detected compounds and sensory evaluation scores of EVOO. As a result, we found the correlation between certain volatile compounds that would be derived from 13-hydroperoxy-octadecatrienoic acid（13-HpOTE）and the sensory evaluation score. In the future, we will further evaluate the relationship between 13-HpOTE, its cleavage compounds, and fruity score in EVOO.

olive oil, volatile compound, hydroperoxide

発表責任者：仲川清隆（kiyotaka.nakagawa.c1@tohoku.ac.jp）

講演番号：3E06-05
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:00～ ミーティングルーム E

プラズマローゲンの化学合成と LC-MS/MS 定量分析への活用

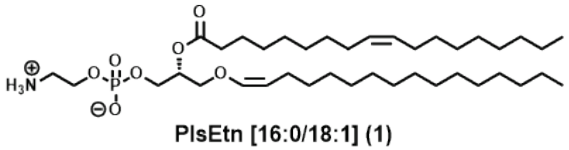
Chemical synthesis of plasmarogen and its application to LC-MS/MS quantitative analysis

○前田 鋭[1]、乙木 百合香[1]、小倉 由資[2,3]、桑原 重文[3]、仲川 清隆[1] ([1]東北大院農・機能分子解析学、[2]東大院農・有機化学、[3]東北大院農・生物有機化学)

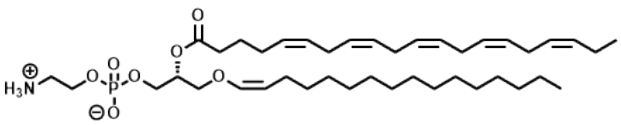
○Satoshi Maeda[1], Yurika Otoki[1], Yusuke Ogura[2,3], Shigefumi Kuwahara[3], Kiyotaka Nakagawa[1] ([1]Food and Biodynamic Chemistry Laboratory, Tohoku Univ., [2]Laboratory of Organic Chemistry, the University of Tokyo, [3]Laboratory of Applied Bioorganic Chemistry, Tohoku Univ.)

【目的】プラズマローゲン (Pls) は、グリセロール 1 位 (*sn*-1 位) にビニルエーテル結合を有するリン脂質の一種であり、アミン部位の違いによりコリン型プラズマローゲンとエタノールアミン型プラズマローゲン (PlsEtn) に大別される。加えてその *sn*-1 位のビニル基と *sn*-2 位のアシル基の組み合わせで、Pls 分子種は多数存在する。本化合物は抗酸化作用などの多様な生物活性を有し、ヒトの脳における Pls の低下はアルツハイマー病などの認知症の発症に関わる可能性があるとして注目されている。この解明に向けて、本研究室では Pls の分子種レベルでの LC-MS/MS 法を構築し[1]、市販の標品種に限りがあることが LC-MS/MS 法を十分に活かしきれない要因であったため、Pls の化学合成法を新たに構築した[2]。そこで本研究では、実際に 2 種の Pls 分子種を化学合成し、これらを LC-MS/MS 法の標品として活用できるよう、イオン化率などの定量精度に関わる事項を明らかにしようとした。

【方法・結果】先の化学合成法に基づき、市販の化合物から十数工程を経て 2 種の PlsEtn (**1**, **2**) を合成した。次いで、リン定量法により濃度決定を行い、市販標品 （PlsEtn (**1**, **2**) とは異なる分子種）と共に LC-MS/MS へ供した。その結果、興味深いことに、PlsEtn のイオン化率は *sn*-2 位脂肪酸の不飽和度に大きく依存することがわかり、故に分子種ごとに検量線を作成して定量する必要があると判断された。現在、本法を用いて、認知症に関連するサンプルの定量分析を進めている。



PlsEtn [16:0/18:1] (1)



PlsEtn [16:0/20:5] (2)

Plasmalogen (Pls), an important class of vinyl ether-linked phospholipid, has various molecular species. We previously developed a LC-MS/MS method to quantitate Pls at the molecular level[1], although analyte species were limited due to lack of available external standards. In this study, two Pls species (**1**, **2**) were newly synthesized and used to evaluate accurate quantitation by LC-MS/MS. Interestingly, it was found that the ionization efficiency of Pls depended on its the number of fatty acid double bounds, which meant external standard curves were needed in each Pls molecular species to achieve accurate quantitation. The method is currently applying to quantitate Pls molecular species in biological samples.

1) Y. Otoki, *et al*., *J. Pharm.* **2017** 77-85. 2) 前田鋭 他, 日本農芸化学会東北支部 第 154 大会, **2019**

＊ 本研究の一部は、農研機構生研支援センター「「知」の集積と活用の場による研究開発モデル事業」の支援を受けて実施した。

Phospholipid, Total synthesis, Molecular species

講演番号：3E06-06
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:00～ ミーティングルーム E

イチジク由来セリンプロテアーゼの精製と性状解析

Purification and characterization of serine protease from *Ficus carica*

○上島 直生[1]、西村 耕作[1,2]、東矢 圭右[1]、兒島 憲二[1]、滝田 禎亮[1]、阿部 竜也[2]、高橋 徹[2]、保川 清[1] ([1]京大院・農、[2]（公財）東洋食品研究所)

○Naoki Ueshima[1], Kosaku Nishimura[1,2], Keisuke Higashiya[1], Kenji Kojima[1], Teisuke Takita[1], Tatsuya Abe[2], Toru Takahashi[2], Kiyoshi Yasukawa[1] ([1]Grad. Sch. of Agric., Kyoto Univ., [2]Toyo Institute of Food Technology)

【目的】

イチジク(*Ficus carica* L.)樹液はシステインプロテアーゼであるフィシンに代表されるタンパク質分解酵素を含み、肉軟化剤などに用いられてきた。近年イチジクの 1 品種ブラウンターキーの樹液中で未変性状態のコラーゲンを分解するセリンプロテアーゼが同定された [1)]。我々はこれまでに、イチジク 23 品種にセリンプロテアーゼ（以下、Fcol と呼称）が含まれていることを報告した [2)]。本研究では、Fcol のアミノ酸配列の決定およびコラーゲン分解様式の解析を行った。

【方法と結果】

1.アミノ酸配列の決定：イチジクの 1 品種桝井ドーフィンの樹液から二次元ゲル電気泳動により Fcol を精製し、LC-MS/MS に供し、部分配列を得た。これらを BLAST 検索した結果、*F. carica* 由来ズブチリシン様プロテアーゼの配列と一致した。2.コラーゲン分解様式の解析：ウシの酸抽出コラーゲン（ASC）（完全変性温度 40℃）は Fcol により 32、37℃で分解されず、42℃で一部分解された。ラット ASC（36℃）は 32℃で分解されず、37、42℃で一部分解された。このことから Fcol は、ASC の完全変性温度以下では三重らせん構造を切断しないことが示され、先行報告 [1)]と異なった。また、Fcol 処理によって得られたウシ ASC 断片の配列解析から、Fcol は Gly 残基の N 末端側を切断しており、C 末端側を切断するフィシンとは切断様式が異なることが示された。

【文献】

1. B. Raskovic et al. (2014) *J. Biosci. Bioeng.* 118, 622-632
2. K. Nishimura et al. (2020) *J. Food Sci.* 85, 535-544

【Purpose】

Fig (*Ficus carica* L.) latex contains proteolytic enzymes such as a cysteine protease ficin and has been used as a meat tenderizer. Recently, a serine protease which degrades native collagen was identified in the latex of a *F. carica* cultivar Brown Turkey[1)]. We have previously reported that a serine protease is present in 23 fig cultivars and termed it Fcol[2)]. Here, we determined its amino acid sequence and analyzed its collagen degradation pattern.

【Methods and Results】

1. Determination of amino acid sequence: Fcol was purified by two-dimensional gel electrophoresis, and the partial amino acid sequences were determined via LC-MS/MS. BLAST searches revealed that these sequences were identical with those of a subtilisin-like protease from *F. carica*. 2. Collagen degradation pattern: Bovine Acid Soluble Collagen (ASC) (denaturation temperature (T_d): 40°C) was not degraded at 32 or 37°C and partially degraded at 42°C by Fcol. Rat ASC (T_d: 36°C) was not degraded at 32°C and partially degraded at 37 or 42°C. These results suggested that Fcol did not cleave the triple-helix structure at temperatures below T_d, which was not in agreement with the previous report[1)]. Sequence analysis of the bovine ASC fragments generated by Fcol treatment revealed that Fcol cleaved the N-terminus of the Gly residue, which was different from ficin that cleaves its C-terminus.

【References】

1. B. Raskovic et al. (2014) *J. Biosci. Bioeng.* 118, 622-632
2. K. Nishimura et al. (2020) *J. Food Sci.* 85, 535-544

Collagenolytic activity, Enzyme purification, Fig latex

講演番号：3E06-07
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:00～ ミーティングルーム E

酵素剤プロテアックスからのアミノペプチダーゼの精製と特性、及びアミノペプチダーゼによるタンパク質加水分解物の苦味除去

Purification and characterization of aminopeptidase from the enzyme reagent Proteax and reduction of bitterness of protein hydrolysate by the purified aminopeptidase

○中村 梨乃、田口 楓、齋藤 愛未、廣田 圭佑、丸山 美香、林 清（東洋大学）
○ RINO NAKAMURA, KAEDE TAGUCHI, MANAMI SAITO, KEISUKE HIROTA, MIKA MARUYAMA, KIYOSHI HAYASHI (Toyo Univ.)

タンパク質を加水分解すると溶解性、消化吸収性が増すため、加水分解物が食品に利用されている。しかし、タンパク質分子の内部に存在している疎水性アミノ酸を主成分とするペプチドが生成することにより苦味を生じ、食品利用の妨げとなっている。本研究では、酵素剤プロテアックス（天野エンザイム株式会社）からアミノペプチダーゼを精製し、特性解析を行った。さらに、精製したアミノペプチダーゼによるカゼイン加水分解物の苦味除去を検討した。

天野エンザイム株式会社から入手した酵素剤プロテアックスを陰イオン交換体 TOYOPEARL GigaCap Q-650M を使用した FPLC 分取により分離・精製を行った。さらに、精製したアミノペプチダーゼをタンパク質加水分解物に作用させ苦味の低減化を検討した。乳由来カゼイン（富士フィルム和光純薬（株)）を至適条件下（pH2.0, 37℃）で酵素基質比が 1/300 になるようにペプシン（250units/mg SIGMA P7000）を添加し 20 時間反応させ、カゼイン加水分解物を調製した。続いて、カゼイン加水分解物に pH8.0, 50℃でアミノペプチダーゼを作用させた。精製したアミノペプチダーゼの特性及び脱苦味試験の結果は、本講演で詳しく報告する。

Protein hydrolysates are used in foods because proteins become more soluble and digestible and absorbable when hydrolyzed. However, the production of peptides containing hydrophobic amino acids as a main component existing inside a protein molecule impart a bitter taste, which limits the use of hydrolysates in the food processing industry.

In this study, aminopeptidase was purified from the enzyme reagent Proteax (Amano Enzyme Co., Ltd.) by FPLC using the anion exchanger TOYO PEARL GigaCap Q-650M and its characteristics were analyzed. Furthermore, the removal of bitterness of casein hydrolysate by purified aminopeptidase was investigated. The characteristics of the purified aminopeptidase and the results of the debittering test will be reported in detail in this report.

bitterness, protein hydrolysate, aminopeptidase

発表責任者：中村梨乃（s3C102000072@toyo.jp）

講演番号：3E06-08
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:00～ ミーティングルーム E

DMT-(S)-Pro-OSu 誘導体化によるジペプチド一斉分析法の開発と発酵カカオ豆の成分プロファイリング

Dipeptide profiling and quantification in fermented cocoa beans by a combination of DMT-(S)-Pro-OSu derivatization with LC-MS/MS

○寺田 祐子[1]、中山 綾花[1]、久田 拓海[2]、藤谷 将也[2]、福井 芹菜[1]、蟹江 慧[2]、加藤 竜司[2]、繁田 尭[1]、杉山 栄二[1]、水野 初[1]、轟木 堅一郎[1]、伊藤 圭祐[1]（[1]静県大院・薬食、[2]名大院・創薬）
○Yuko TERADA[1], Ryoka NAKAYAMA[1], Takumi HISADA[2], Masaya FUJITANI[2], Serina FUKUI[1], Kei KANIE[2], Ryuji KATO[2], Takashi SHIGETA[1], Eiji SUGIYAMA[1], Hajime Mizuno[1], Kenichiro TODOROKI[1], Keisuke ITO[1] ([1]Univ. Shizuoka, [2]Nagoya Univ.)

【背景・目的】ジペプチドは食品の生理活性やフレーバーなどに関連する重要な成分であるが、対象成分の数が多く、また類似構造成分の分離が難しいことなどから、食品のジペプチド組成を網羅的に分析、定量した報告はほとんどないのが現状である。本研究では誘導体化試薬と UPLC/ESI-MS/MS を組み合わせることで、食品中のジペプチドを網羅的かつ定量的に一斉分析できる分析法を開発し、食品分析の実施例として、発酵カカオ豆の成分プロファイルを明らかとした。

【結果・考察】(*S*)-2,5-dioxopyrrolidin-1-yl 1-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)pyrrolidine-2-carboxylate（DMT-(*S*)-Pro-OSu）を用いて 332 種類のジペプチド標準品を誘導体化し、各ジペプチドについて UPLC-MS/MS 分析での検出に最適なプリカーサーイオン（*m/z*）とリテンションタイムを決定した。レトロ配列の Pro-Thr と Thr-Pro のように分子量と溶出時間が同一のジペプチドについても、DMT-(*S*)-Pro 構造を含む a_1 フラグメントイオンを検出することで、一斉分析を可能とした。本分析法では、食品分析の報告としては最も種類の多い、ジペプチド 332 種の一斉分析、129 種の一斉定量が可能であった。また、ジペプチドの網羅的分析データを用いることで、物理化学的な構造情報から溶出時間を高精度に予測できる機械学習モデルの構築にも成功した。このモデルはジペプチド以外の様々な成分の分析にも応用が期待できる。

続いて開発した分析法により実際にブラジル、ガーナ、グレナダ、ハイチ産の発酵カカオ豆を分析した結果、産地ごとにジペプチド組成は異なることが明らかとなった。ジペプチドはメイラード反応の原料となることで、チョコレートなどカカオ製品のフレーバーに複雑な多様性を与え得ることが示唆された。また、全ての発酵カカオ豆に共通して、強力な DPP-IV 阻害活性（抗 2 型糖尿病）を有する Trp-Pro が高濃度に含まれていることが明らかとなった。

In the present study, a comprehensive analysis method for dipeptides, which is highly sensitive and quantitative, was established combing DMT-(*S*)-Pro-OSu derivatization with UPLC/ESI-MS/MS. The analytical method enabled simultaneous identification of 333 dipeptides and quantification of 129 dipeptides, the largest number in so far food research. The analytical behavior of dipeptides was subsequently analyzed by a machine learning model that can predict elution time *in silico*. Using the comprehensive analysis method, we successfully clarified dipeptide profile of fermented cocoa beans from different geographical origins.

dipeptide, cocoa bean, machine learning model

発表責任者：伊藤圭祐（sukeito@u-shizuoka-ken.ac.jp）

講演番号：3E06-09
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:00～ ミーティングルーム E

ファージディスプレイ法によるポリフェノール修飾タンパク質結合ペプチドの探索

Exploiting peptide sequences interacting with polyphenol-modified proteins by phage display technology

○山本 広史、佐々木 栄太、板倉 正典、内田 浩二（東大院農生科）
○Hiroshi YAMAMOTO, Eita SASAKI, Masanori ITAKURA, Koji UCHIDA (Univ. of Tokyo)

ポリフェノールの酸化体は、タンパク質表面の求核性アミノ酸残基と反応し、タンパク質を化学修飾することが知られているが、その機能はよくわかっていない。そこで本研究では、ポリフェノール修飾タンパク質と相互作用するペプチドを探索し、得られたペプチド配列の特徴から、ポリフェノール修飾タンパク質と相互作用するターゲットタンパク質の同定を試みることを目的とした。赤ワイン由来のポリフェノールであるピセアタンノールで修飾した牛血清アルブミン（Pic-BSA）を固相化し、ファージディスプレイ法を用いて構築したランダム 15 アミノ酸からなる T7 ファージライブラリーを混合した。Pic-BSA と結合したファージの溶出・増殖サイクルを繰り返した後、ELISA 法によるスクリーニングを行うことで、Pic-BSA に親和性を示すモノクローナルファージを複数獲得した。得られたペプチド配列を解析したところ、有意にアルギニンの割合が高くなっていた。また得られたペプチドは、ピセアタンノール以外のポリフェノールに由来する修飾タンパク質にも親和性を示した。特に強い親和性を示した２種類のペプチドについては、緑色蛍光タンパク質に融合することで、より詳細な解析を行った。今後は、本研究で発見したペプチドと類似するような、アルギニンを多く含む配列を有するタンパク質と、ポリフェノール修飾タンパク質との相互作用に着目することで、ポリフェノール修飾タンパク質が生体内で示す機能を明らかにしたい。

Oxidized polyphenols are known to react with nucleophilic amino acid residues of proteins, however, biological functions of such protein modifications remain elusive. Here, we aimed to identify proteins interacting with polyphenol-modified proteins by using phage-displayed random peptide library screening. To prepare a polyphenol-modified protein, bovine serum albumin (BSA) was incubated with piceatannol, a polyphenol derived from a red-wine component. The resulting modified protein, Pic-BSA, was immobilized on a plate, and the T7 phage library presenting random 15-mer amino acids was applied to identify peptides possessing high affinity to Pic-BSA. Sequence analysis of the obtained peptides showed a significantly high appearance ratio of arginine residues compared to the probability calculated for the average sequence of the original library. Based on this study, we predicted that polyphenol-modified proteins might have potential to interact with endogenous proteins with arginine-rich sequence regions. Further studies along this line will be focused in future.

Polyphenol-modified protein, Phage display, Peptide

発表責任者：内田 浩二（a-uchida@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3E06-10
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:00～ ミーティングルーム E

アスパラギン酸トランスアミナーゼを利用したアスパラギン酸測定キットの開発

Development of an L-aspartic acid assay kit utilizing L-aspartate transaminase

○西山 辰也[1,2]、ウォロ　トリアルシ スリスティアニンディア[1]、新舘 啓子[1]、上田 賢志[2]、日下部 均[1] ([1]株式会社エンザイム・センサ、[2]日大生資科)
○Tatsuya NISHIYAMA[1,2], Woro Triarsi Sulistyaningdyah[1], Keiko SHINTATE[1], Kenji UEDA[2], Hitoshi KUSAKABE[1] ([1]Enzyme sensor. co., ltd., [2]College of Bioresource Sciences, Nihon Univ.)

【背景・目的】L-アスパラギン酸（L-Asp)は疲労回復や金属の吸収を補助する効果が報告され、サプリメントとして市販されている。また農作物にも豊富に含まれていることなどから、その濃度測定に一定のニーズがある。しかし、その定量法は、測定装置が大型で高額であることや、操作が煩雑で専門知識や訓練が必要であるなどの問題点を抱えている。この問題解決には、化合物を測定する際に最も一般的に使用される手法である吸光度測定が有効と考えられた。そこで、吸光度を測定することで L-Asp 濃度を簡便に定量する酵素キットの開発を行った。
【方法・結果】我々が以前に開発した、L-グルタミン酸オキシダーゼ（GLOD）を用いた比色法による L-Glu 定量系を応用した。GLOD は L-グルタミン酸（L-Glu)の酸化反応を触媒する酵素であり、厳密な基質特異性を示す。パーオキシダーゼ、4-アミノアンチピリン、フェノール化合物存在下で本酵素が L-Glu を酸化すると、生成した過酸化水素により色素化合物が生産される。この色素による光吸収を測定することで間接的に L-Glu を定量できる。そこで、L-Asp を L-Glu に変換する L-Asp アミノ基転移酵素（GOT）を取得し、上記の系に加えることで、L-Asp を定量する酵素反応系を構築した。大腸菌由来の GOT を、同菌を宿主に pET-26b(+)を発現プラスミドに用いて大量発現させた。次に、本組換え酵素を精製し、キット化に向けた本酵素の諸性質を調べた。さらに各酵素および発色試薬の組み合わせや濃度の検討を行い、最適な組成を見出し、様々な農作物の L-Asp 濃度を測定した。

L-aspartic acid (L-Asp) is known for the effect assisting fatigue recovery and metal absorption, and thus it is commercially available as a supplement. However, measurement of L-Asp depends on the use of expensive hardware and advanced techniques. Here, we report the development of an enzyme assay kit using a simple photometry. Previously, we developed a glutamate assay kit using L-glutamate oxidase. The kit enabled easy photometric measurement of L-glutamate based on its coupled reaction with peroxidase, which performed H_2O_2-depndent pigment formation. We applied this kit to the measurement of L-Asp by coupling it with the reaction of L-aspartate transaminase (GOT) that converts L-Asp to L-glutamic acid. GOT of *E. coli* was overproduced and purified by the *E. coli* host-vector system, and assessed for the enzymatic properties. This GOT was added to the system was further studied for the optimum condition. Thus developed enzyme kit was used to measure L-Asp content of commercial vegetables.

L-aspartic acid, aminotransferase, transaminase

講演番号：3E06-11
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:00～ ミーティングルーム E

赤小豆中のカテキノピラノシアニジン A,B の定量分析

Quantification of catechinopyranocyanidins A and B in red Adzuki bean

○高山 陽子、数馬 恒平、吉田 久美 (名大院情)
○YOKO TAKAYAMA, KOHEI KAZUMA, KUMI YOSHIDA (Nagoya Univ.)

【目的】赤小豆(*Vigna angularis*) の種皮には、アントシアニンはほとんど存在せず、カテキノピラノシアニジン A, B と命名した紫色色素が含まれる [1)]。この色素はシアニジンとカテキンが縮環した構造を持ち、A と B はカテキン部分の立体が異なる。水には溶けず有機溶媒に可溶な色素であるが、製餡加工における煮熟中に熱水に溶けた色素が無色の子実由来の餡粒子に結合することで、さらし餡が紫色になる。小豆の用途の大部分は餡への加工であり、餡色のよい小豆の育種は極めて重要である。紫色色素の定量法が確立されれば、品種、育成環境による色素組成の差が解明され育種や選抜の際の重要な指標として利用できる。また、高品位な餡の製造においても不可欠な技術となると考えられる。そこで、赤小豆に含まれる紫色色素の定量方法の確立を目指し研究を行った。
【方法および結果】赤小豆の乾豆を吸水させた後凍結し、様々な抽出方法を検討した。また、カテキノピラノシアニジン A, B の溶液は光に不安定で容易に分解するため、できるだけ暗所で処理を行った。抽出溶媒、抽出時間、温度、ならびに方法、および繰り返し回数などについて条件を変えて実験した結果、効率良く紫色色素を溶出させる方法を確立した。さらに、HPLC を用いた定量分析条件を検討し、品種の異なる赤小豆に含まれる紫色色素の含有量の定量分析を実施した。定量に際し用いる色素標品の純度については、NMR を用いた絶対純度の検定法を現在検討中である。

The seed-coat of small red-bean (*Vigna angularis*, Adzuki in Japanese,) contains two purple pigments, catechinopyranocyanidins A and B. The beans are primarily used to produce the “an-paste” component of Japanese sweets. Although the pigments are practically insoluble in water, through the manufacturing process, the purple pigment is transferred to the colorless “an-particles”, imparting a purple color. To obtain a high-quality an-paste, breeding of adzuki bean containing a high amount of purple pigment is important. For this purpose a method for quanititative analysis of the purple pigments is essential. We studied various extracting conditions of the pigments and by using HPLC content of catechinopyranocyanidins A and B in different cultivars were quantified.

1) K. Yoshida et al., *Sci. Rep.*, **9**, 1484 (2019)

Vigna angularis, catechinopyranocyanidin, HPLC analysis

講演番号：3E06-12
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:00～ ミーティングルーム E

かつお節香気の呈味増強成分探索手法としての、新規評価技術テイスティング-GC™ の活用

Utilization of new evaluation technology Tasting-GC™ as a method for searching for flavor compounds that enhance the taste of dried bonito

○菅 一也、朝比奈 尚紀、葛西 賢造、木村 公子（曽田香料株式会社）
○Kazuya SUGA, Naoki ASAHINA, Kenzo KASAI, Kimiko KIMURA (Soda Aromatic Co.,Ltd.)

かつお節の香気はだしの塩味やうま味を増強する効果を有するとされている [1]。しかしながら多数の香気成分の中で、どういったものが、どのような呈味に影響しているのかを網羅的に探索した報告はこれまでに為されていない。今回、匂いかぎ分析 GC-O を応用した新評価手法「テイスティング-GC™」を活用し、かつお節香気の中から各種スープの呈味に寄与する成分を探索した。テイスティング-GC とは、図のように食品を飲用しながら“口を介して”GC-O を行う手法で、食品の風味に効果のある香気成分を迅速かつ簡便にスクリーニング可能である [2]。

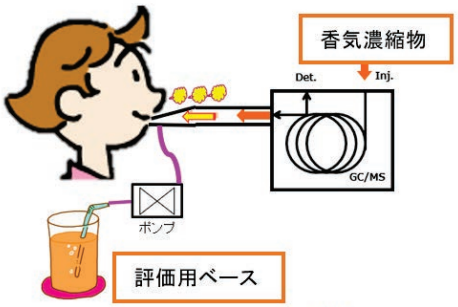


図 テイスティング-GC™装置図

かつお節超臨界抽出物を薄膜蒸留して香気成分濃縮物を取得、テイスティング-GC の試料に供した。スニッフィングポートはストロー状に加工し、市販粉末だしをお湯で希釈したものを評価用ベースとして一定速度で供給、GC 分離成分と混合して評価した。実験の結果、4-ethylguaiacol 等の複数成分がだしのうま味を増強させることを確認した。さらに、飲用する食品をラーメンスープなどに変えることで、呈味への寄与成分の変化を検証した。

The aroma of Katsuobushi (dried bonito) is known to enhance a soup-stock taste, but there are few reports which comprehensively research the odor compounds to influence the taste. We developed the new method called Tasting-GC™ to elucidate the potent volatile compounds enhancing the taste. This method is continuously to mix the odor compounds separated by GC and the liquid evaluation base input to the sniffing port. Holding the sniffing port in the mouth makes it possible to screen volatile compounds showing odor-taste interactions quickly and totally. The dried bonito aroma was evaluated with instant soup stock by Tasting-GC. As a result, 4-ethylguaiacol enhanced the umami of stock.

The further study will also be presented in this symposium.

1) Y. Ogasawara, *et al., J. Food Sci.,* **81**, C308-C316 (2016)
2) 曽田香料株式会社. 揮発性成分の評価方法およびそれに用いる装置. 特許第 6788204 号.

Dried bonito, Retronasal aroma, Umami

発表責任者：菅　一也（Kazuya_Suga@soda.toray.co.jp）

講演番号：3E06-13
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:00～ ミーティングルーム E

レモングラス精油の香気劣化抑制に対するα-トコフェロールと各種抗酸化物の相乗効果の解析

Analysis of the synergistic effect of α-tocopherol and various antioxidants against the aroma deterioration of lemongrass essential oil

○太田 香穂[1,2]、宮崎 真緒[1]、立山 優香[1]、小林 弘司[1]、石川 洋哉[1]([1]福岡女子大院、[2]株式会社　クマモト敬和)
○ Kaho Ohta[1,2], Mao Miyazaki[1], Yuka Tateyama[1], Hiroshi Kobayashi[1], Hiroya Ishikawa[1] ([1]Fukuoka women's Univ., [2]Kumamoto KEIWA)

食品の香りは、加工・貯蔵中の酸化反応により大きな影響を受け、結果として食品品質が大きく損なわれる。通常、食品の酸化反応の抑制を目的として、各種抗酸化物が酸化防止剤として利用されている。本研究では、レモングラス精油の香気成分に対するα-トコフェロールと各種抗酸化物の酸化抑制効果を検討するとともに、α-トコフェロールと各種抗酸化物の併用を試み、2 成分間での相乗効果の発現挙動について検討した。

抗酸化物として、α-トコフェロール、ロスマリン酸等の化合物を用いた。レモングラス精油サンプルの酸化抑制試験を、各抗酸化物の単一およびα-トコフェロールとの併用下で実施した。その後、超高速 GC により、各香気成分に対する各種抗酸化物の酸化抑制効果を確認した。抗酸化物の相互作用解析は、median effect analysis を用いて行った。得られた median effect analysis の結果に基づいて、Combination Index (CI) 値を算出し、相乗(CI＜1)、相加(CI≒1)、相殺効果(1＞CI)を判定した。

まず、α-トコフェロールと各種抗酸化物単独での効果を確認した結果、レモングラス精油中の主要香気成分である Citral 等に対して、α-トコフェロールよりもロスマリン酸、ケルセチン等が高くなり、没食子酸等は類似の効果を示すことが判明した。続いて、α-トコフェロールとの併用効果を検証した結果、単一使用時には効果の高かったロスマリン酸との併用では相殺効果が確認されたが、比較的効果の低かったケンフェロールとの併用では相乗効果が認められた（CI 値 0.2～0.6)。これにより、併用する抗酸化物によって、レモングラス精油中香気成分の酸化抑制効果が異なることが示された。

The aroma of food is affected by the oxidation during processing and storage, and result in the deterioration of its quality. Antioxidants are used for suppressing the oxidation. In this study, we analyzed the effects of α-tocopherol and various antioxidants on oxidation of aroma components of lemongrass essential oil. The combination effects between α-tocopherol and other antioxidant are also examined using median effect analysis.

Deterioration of each aroma component was confirmed by using an ultra-high-speed GC analysis. Median effect analysis was used for the interaction analysis of antioxidants.

The results showed that rosmarinic acid and quercetin had higher antioxidative activities on citral, which is the main component of lemongrass essential oil, oxidation than those of α-tocopherol and gallic acid. Subsequently, the combined effects of antioxidants with α-tocopherol were examined. Synergistic effects were obtained when used with kaempferol (CI value 0.2 to 0.6), on the other hand, antagonistic effects were obtained when used with rosmarinic acid.

antioxidant, flavor, GC

発表責任者：石川洋哉（ishikawa@fwu.ac.jp）

講演番号：3E06-14
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:00～ ミーティングルーム E

アスタキサンチン製剤が加熱ソーセージの脂質酸化に与える影響

The effects of astaxanthin formulations on lipid oxidation in cooked pork sausages

○渡嘉敷 柚、三上 奈々、島田 謙一郎（帯畜大院）
○Yuzu TOKASHIKI, Nana Mikami, Kenichiro Shimada (Obihiro Chikusan Univ.)

【目的】アスタキサンチン（AX）は魚類や甲殻類、緑藻などの海洋生物に含まれるカロテノイド色素であり、強力な抗酸化性をはじめとし、視機能改善・美肌効果など様々な機能性を有する。一方で食品加工分野での活用例は少なく、食肉製品のような脂質を多く含む食品での抗酸化性は評価されていない。本研究では、強力な抗酸化能と健康機能を備える *Haematococcus pluvialis* 由来 AX がソーセージ中の脂質酸化に与える影響を調べることを目的とした。
【方法】豚ひき肉に対しラード 20%、食塩 2%を加えたベース生地（CON）に、2 種類の AX 製剤（AX10%脱臭オイル（アスタキサンチン 1OS：AO）又は AX5%水溶液（アスタキサンチン 5%AWS: AW）、FUJIFILM）を AX 含量が 0.01%となるよう添加した群をそれぞれ AO、AW とし、ソーセージを製造した。ソーセージは 4℃冷暗条件下で貯蔵し、0,2,4,6,8 日後に脂質酸化（過酸化物価（POV）及びチオバルビツール酸（TBA）価）を測定した。
【結果】保存期間中を通し、POV 及び TBA は AO・AW 添加群で CON 群よりも概ね低い値を示し、脂質酸化が抑制される傾向が見られた。特に、TBA の抑制効果は、AW 群では AO 群と比較して高い傾向が見られた。AO・AW 群の AX 含量は等量であることから、製剤中における AX の形態の違いが酸化抑制効果に影響することが推察された。

Astaxanthin (AX) is one of carotenoids widely found in marine organisms and has strong antioxidant properties. However, there are little examples of its application on food processing. Thus, we aimed to investigate the effects of AX from *Haematococcus pluvialis* on lipid oxidation in lipid-rich cooked pork sausages. Minced pork meat was mixed with 20% (w/w) lard and 2% (w/w) salt, and without (CON) or with 0.01% AX (two types of the formulation; AO (AX 10% deodorizing oil (astaxanthin 1OS)) or AW (AX 5% aqueous solution (astaxanthin 5% AWS), FUJIFILM)), and cooked. We evaluated lipid oxidation of the sausages by peroxide value (POV) and thiobarbituric acid (TBA) values) after storage at 4 °C for 0,2,4,6 and 8 days. Throughout the storage period, POV and TBA were lower in AO and AW than CON. Particularly, the suppressing effect of AW on TBA tended to be stronger than that of AO even though the AX contents in AW and AO were equal. These results suggest that AX is a possible material for inhibition of lipid oxidation in sausages and a difference of AX form affect a degree of the effect.

astaxanthin, lipid oxidation, pork sausage

講演番号：3E06-15
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:00～ ミーティングルーム E

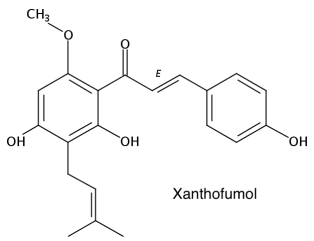
ビール中の黄色低分子色素化合物の単離と同定

Isolation and identification of yellow low-molecular-weight pigment from beer.

○桐原 明里、野田 響子、村田 容常 (お茶の水女子大学)
○AKARI KIRIHARA, KYOKO NODA, MASATSUNE MURATA (Ochanomizu Univ.)

【背景・目的】ビールは色調が嗜好性に大きく影響を与える食品の一つである。しかし、ビールの色は主にメラノイジンによると考えられるため色素の化学的研究は少ない。本研究室の先行研究においてビールの塩基性物質画分から低分子色素として perlolyrine を単離・同定した。[1] 本研究では、中性物質画分にも色素を見出したため単離・同定した。

【方法・結果】黒ビールを酢酸エチルで酸性物質画分、中性物質画分、塩基性物質画分、水溶性物質画分に分画し、各画分を DAD-HPLC で分析した結果、中性物質画分に極大吸収を 370 nm に持つ色素化合物を見出した。本物質を黒ビールタイプの発泡酒（10 L）から酢酸エチルで抽出した後、ODS カラムクロマトグラフィーで精製し、分取 ODS-HPLC により単離し、黄色ペースト（4.6 mg）として得た。質量分析 *m/z* 355.1533(M+H)$^+$より分子式を $C_{21}H_{22}O_5$ と決定し、NMR 分析により部分構造を推定した。これらの結果に基づきデータベースを検索した結果、本物質を xanthohumol と同定した。Xanthohumol はホップ成分として知られ、ホップに由来すると考えられた。市販ビールならびに発泡酒 13 種類を分析したところ、xanthohumol は淡色のビール、発泡酒より濃色のビール、発泡酒に多く存在した。



Xanthofumol

1) Nagai et al., *Food Sci. Technol. Res.*, **25**, 81 (2019)

The color of beer is mainly attributed to melanoidins, which is difficult to chemically analyze. Here we isolated a low-molecular-weight pigment from black beer. This compound was extracted from black beer type liquor (10 L) with ethyl acetate. The ethyl acetate fraction was purified using OSD column and preparative ODS-HPLC. This compound was obtained as yellow paste (4.6 mg). As a result of LC-MS, its molecular formula was $C_{21}H_{22}O_5$, (*m/z* 355.1533(M+H)$^+$). The partial structures were determined by ^{1}H- and ^{13}C-NMR. From these data, this compound was identified as xanthohumol. Xanthohumol is a component of hop. The analysis of 13 types of commercial beer and beer type liquor showed that almost beer and beer type liquor contained xanthohumol and that black type beer contained more xanthohumol that pale type ones.

Beer, xanthofumol, pigment

講演番号：3E06-16
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:00～ ミーティングルーム E

特徴的な香気成分を同定するアロマデザイナーの開発
Development of an aroma designer to identify key odorants

○宮崎 雅雄[1]、喜多 純一[2] ([1]岩手大学、[2]島津製作所)
○Masao MIYAZAKI[1], Junichi KITA[2] ([1]Iwate Univ, [2]Shimadzu)

食品や工業製品、ペットや環境などからは様々な揮発性化合物が放出され、それらが複雑な組成で混ざり合い、多様なにおいが形成されている。しかしすべての揮発性化合物がにおい形成に重要な役割を果たしているわけではなく、においの特徴化にあまり寄与していない成分も多く含まれている。そこでにおい形成に重要な揮発性化合物を効率的に同定する手法の開発が香料の開発や悪臭の防止策考案に求められていた。そこで我々は、ガスクロマトグラフ質量分析計を改良して、においを形成する化合物の組成を自由に組み替えることのできる分析装置（アロマデザイナー）を開発した。アロマデザイナーは、においの構成成分を一度ガスクロマトグラフィーで分離後、流路を切り替えるスイッチング素子を介して、官能評価したい成分のみアロマデザイナーに送ってにおい袋に回収してにおいを再構築でき、この時においから取り除きたい成分は質量分析計に送って容易に除去できる仕組みになっている。本研究では、特徴的な香気成分を探索する官能評価法の一つであるオミッション法の試料作製にアロマデザイナーが本当に有効であるか検証した。オミッション法は、化学組成に従い香料を調合してにおいを再現する際、全てを含む基準臭と1つ又は複数成分を除いた除去臭を作り、それらを嗅ぎ比べて除いたらにおいが変わる成分を探索する手法である。これは、におい形成に重要な成分を特定するために非常に有効な手法である。しかしオミッション試料の作成には、においを構成する成分の同定や標品の準備、用手法での香料調合に非常に手間がかかるなど問題点があった。我々は、においからガスクロマトグラフ用の試料として回収でき、且つ 250℃程度の熱に安定な化合物であればアロマデザイナーで容易にオミッション試料を作成できることを明らかにできた。また複雑な組成比を示すものであっても容易に基準臭や除去臭の作成が可能になった。よってアロマデザイナーは特徴的な香気成分の分析に非常に有用であることが分かった。

Foods, materials, and animals emit many volatile compounds, some of which are key odorants producing characteristic odor. All volatile compounds do not contribute to odor production. Thus, it is necessary to identify key odorants from each sample for developments of flavor, fragrance, and deodorants. The omission method is useful to identify key odorants. In the method, a standard sample consisted of all volatile compounds and test samples, which are omitted one or some volatiles, are reconstructed by mixing authentic chemicals. Then, odor qualities are compared between the standard and the test samples by sniffing; if odor qualities are different between two samples, the omitted compounds are key odorants. However, it is not easy to prepare omission samples, because we have to identify chemical structures of compounds consisting of target odors, obtain authentic compounds, and reconstruct target odors that may be consisted of several compounds. To overcome these problems, we developed an aroma designer which is consisted of gas chromatograph-mass spectrometry with switching device and sampler to recover volatile compounds for olfactory evaluation.

GCMS, Aroma, odorant

発表責任者：宮崎雅雄（mmasao@iwate-u.ac.jp）

講演番号：3E06-17
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:00～ ミーティングルーム E

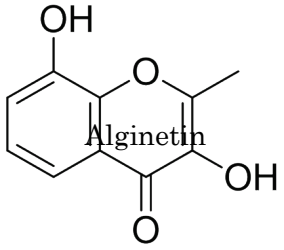
アルギン酸加熱物中のポリフェノールの同定とその抗酸化的性質

Identification of a polyphenol from thermal-treated alginic acid and its antioxidant-related properties.

○土居 采矢佳、増田 俊哉（大阪市大院生活）
○Sayaka DOI, Toshiya MASUDA (Osaka City Univ.)

【研究目的】食品の調理・加工において基本的な操作として高温加熱があげられる。食品中の糖質は，高温加熱によるカラメル化において，主に褐変物質や香気成分を生成することが知られているが，脱水・環化反応により，ポリフェノールも生成することがある。ポリフェノールは適度な疎水性があり，水素結合をする多数のフェノール基を持つため，抗酸化活性などの機能性を示す。また，食品多糖は多様な構造の単糖からなることが多く，様々なポリフェノールを生成する可能性がある。本研究では，食品多糖の中でも特殊な単糖を含むことが多く，現在食用資源として十分には利用されていない海産多糖に注目した。

【方法と結果】海産多糖（寒天，アルギン酸，カラギーナン，キチン，フコイダン）を 200℃で 1 時間加熱したところ，いずれも加熱前より DPPH ラジカル消去能が増加した。その中でもアルギン酸とフコイダンの加熱物が高い活性を示した。アルギン酸の加熱物の HPLC 分析により，DPPH ラジカルを消去するピークを検出し，そのピーク物質を単離した。その物質は NMR，MS の結果より 3,8-ジヒドロキシ-2-メチルクロモン（アルギネチン）であることがわかった。また，単糖（ガラクツロン酸，グルクロン酸，フルクトース，ガラクトース，グルコース）を溶液状態で 130℃，1 時間加熱したところ，いずれも加熱前より DPPH ラジカル消去能が増加した。特にアルギン酸の構成単糖であるウロン酸類の加熱物が高い活性を示した。HPLC 分析の結果，ウロン酸の加熱によってもアルギネチンが生成されることがわかった。さらに，単離したアルギネチンを用いて，その抗酸化活性をいくつかの化学的方法で測定した（DPPH ラジカル消去能，Fe(Ⅲ)還元能，ORAC 法，脂質抗酸化活性）。その結果，アルギネチンはトロロックスと比較して，ラジカルとの反応速度は小さいが，化学量的な活性は高い物質であることがわかった。
（本発表には，昨年度中止学会で発表予定の内容を含む。）



The DPPH radical scavenging activity was increased by the high-temperature treatment of marine polysaccharides. The heated product of alginic acid showed the maximum activity, and alginetin was identified as the radical scavenger. As a result of examining its antioxidant activity by chemical methods, it has a stoichiometrically higher antioxidant capacity than Trolox.

polyphenol, marine polysaccharide, antioxidant

講演番号：3E06-18
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:00～ ミーティングルーム E

ツタンカーメンエンドウに含まれる抗酸化成分の探索および同定

Identification of antioxidant components from Tutankhamun's pea

○前川 優樹[1]、近藤(比江森) 美樹[1,2] ([1]徳島文理大院人間生活、[2]徳島文理大人間生活)
○Yuuki MAEKAWA[1], Miki HIEMORI-KONDO[1,2] ([1]Grad. Human life Sci. Tokusshima bunri Univ., [2]Human life Sci. Tokusshima bunri Univ.)

【目的】紫色の莢と花を持つエンドウ(*Pisum sativum* L.) は、ツタンカーメンエンドウと呼ばれている。その未熟な豆は、一般の品種に比べて高い抗酸化性を有している。我々は既に、当該エンドウの水抽出物に含まれる抗酸化成分として、(エピ)ガロカテキンの 2 量体を報告している。しかし、他の抗酸化成分の存在が示唆されている。本研究では、ツタンカーメンエンドウの抗酸化性の全体像を明らかにするために、抗酸化成分のさらなる探索および同定を試みた。
【方法】当該エンドウからアセトン/水/酢酸(70/29.5/0.5, v/v/v)の混合溶液による抽出物を調製した。次いで、HILIC カラム(Shodex HILICpak VN-50 4D)を備えたフォトダイオードアレイ検出器付き高速液体クロマトグラフィー(HPLC)によって成分を分画し、DPPH ラジカル消去活性を指標に抗酸化活性を有する画分を特定した。さらに、当画分に含まれる抗酸化成分を HPLC により単離し、液体クロマトグラフィータンデム質量分析装置(LC–MS/MS)に供した。
【結果および考察】抗酸化活性を有する複数の成分を単離した。そのうち、高い活性を示す主要成分は、MS 分析のネガティブおよびポジティブモードにおいて、m/z 305 および 307、609 および 611、913 および 915 のシグナルを与えた。これらペアレントイオンに対する MS/MS のフラグメントは、(エピ)ガロカテキンの 1 ～3 量体に帰属した。よって、当該エンドウの主要抗酸化成分を(エピ)ガロカテキンのオリゴマーと同定した。さらに、m/z 608 および 610、760 および 762 のシグナルを与える 2 つの抗酸化成分は、MS/MS スペクトルから(エピ)ガロカテキンの構造を有する可能性が示された。以上から、ツタンカーメンエンドウの抗酸化性には、(エピ)ガロカテキンの構造を有する複数の化合物が関与することが示唆された。本研究は、JSPS 研究費 17K00838 の助成を受けて実施した。

A variety of pea (*Pisum sativum* L.) with purple flowers and pods is known as Tutankhamun's pea. The immature pea possesses higher antioxidant activity than the normal pea varieties. This study aimed to reveal the antioxidant compounds of Tutankhamun's pea. The antioxidant compounds in the pea extraction with acetone/water/acetic acid were screened by DPPH radical scavenging assay and LC-MS/MS analysis was used to identify the antioxidant as (*epi*)gallocatechin and its oligomers. This study suggested that the antioxidant activity of Tutankhamun's pea is involved in several compounds with the structure of (*epi*)gallocatechin.

Tutankhamun`s pea, antioxidant components, (epi)gallocatechin.

講演番号：3E06-19
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:00～ ミーティングルーム E

日本の伝統的後発酵茶，碁石茶の特徴的な味の解明

Elucidation of characteristic taste of Goishi tea, traditional post fermented tea in Japan

○阪地 満帆、大塚 祐季、柏木 丈拡、島村 智子、受田 浩之（高知大学）
○Michio SAKAJI, Yuuki OTSUKA, Takehiro KASHIWAGI, Tomoko SHIMAMURA, Hiroyuki UKEDA (Kochi Univ.)

日本の高知県長岡郡大豊町で製造される碁石茶は好気的発酵と嫌気的発酵の両方のプロセスを含む二段階発酵茶で，酸味が特徴的な伝統的な飲料である.これまでのところ，その酸味は工程中の乳酸発酵において生成される乳酸に起因すると考えられてきた.しかし，碁石茶の味に関する詳細な研究は行われておらず，呈味成分については不明な点が多いままであった．本研究ではエタノールを用いた ODS オープンカラムにより呈味成分の分画を行なった．その結果，得られた画分の内，酸味を強く示した画分には乳酸がほとんど含まれていなかった．これにより，碁石茶の酸味の形成には乳酸だけでなく，その他の酸味成分の寄与がある可能性が示された．

今回の取り組みは，碁石茶の特徴的な味を科学的手法を用いて可視化するものであり，本研究の成果は地域の伝統的飲料である碁石茶の高付加価値化に資するものであると考えている．

Goishi tea is produced in Otoyo town, Kochi-Prefecture, Japan. It is a two-step fermented tea produced using both aerobic and anaerobic fermentation processes, and has a characteristic sour taste. It has been assumed that the main contributor to its sourness is lactic acid because of anaerobic fermentation during the process. However, detailed research on the taste of Goishi tea has not yet been conducted. In this study, we attempted to describe and further elucidate the taste of Goishi tea using a taste sensing system. The obtained results suggested that, in addition to lactic acid, other sour components also contributed to the sourness of Goishi tea. Among the fractions obtained by flash chromatography using an ODS column with EtOH, strong sourness was detected in the fractions containing little amounts of lactic acid. The results of this research may pave way for the scientific elucidation and draw attention towards the characteristic taste of traditional Goishi tea.

fermented tea, taste sensing system, sourness

発表責任者：島村智子（tomokos@kochi-u.ac.jp）

講演番号：3F02-01
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:30～ ミーティングルーム F

子嚢菌 *Podostroma giganteum* からの新規生物活性物質の探索

Search of new bioactive compounds from *Podostroma giganteum*

○長谷川 美紀子[1]、細矢 剛[2]、小林 啓介[3]、供田 洋[3]、繁森 英幸[4,5] ([1]筑波大院生命環境、[2]国立科博植物研、[3]北里大薬、[4]筑波大生命環境、[5]筑波大 MiCS)

○ Mikiko Hasegawa[1], Tsuyoshi Hosoya[2], Keisuke Kobayashi[3], Hiroshi Tomoda[3], Hideyuki Shigemori[4,5] ([1]Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, [2]Dep. Bot., NMNS, [3]Fac. Pharm. Sci., Kitasato Univ., [4]Fac. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, [5]MiCS, Univ. Tsukuba)

微生物からの生物活性物質の探索は古くより行われており、医薬品のリード化合物として広く利用されてきた。また、真菌症治療薬アムホテリシン B（AmB）のように、臨床上有用な薬でも重篤な副作用が生じることもあり現在も新たな医薬品の開発は常に必要とされている。しかしながら、真菌類の中には未活用のものもあり、とりわけ小型・非土壌性の子嚢菌類はその種類の豊富さに関わらず研究対象として扱われるものは少なかった。そこで本研究では、未活用子嚢菌類を研究材料として新規生物活性物質を探索することを目的とする。

20 種の子嚢菌類について生物活性を指標に評価し、顕著な活性を示した *Podostroma giganteum* を選別した。本菌株を振盪培養した後、菌体部と上清部に分離しそれぞれ抽出および分配を行った。生物活性を指標にしてシリカゲルカラムクロマトグラフィーおよび逆相 HPLC を用いて上清部から新規化合物 **1** および **2** を単離し、2D NMR および MS などの機器分析によりそれらの構造を明らかにした。また、これらの化合物には、顕著な AmB 抗真菌活性増強作用が認められた。

Microorganisms have been used to search for bioactive compounds which can be used as drug-lead compounds. In addition, even clinically useful drugs such as amphotericin B (AmB), which is a therapeutic drug for deep-seated mycosis, may cause serious side effects, and the development of new drugs have always been required even now. Since there are some ascomycete which are very small, grow on non-soil, these ascomycetes haven't used for research because it's hard to collect. Therefore, the purpose of this study is to search for new bioactive substances from unexplored ascomycetes.

As result of the bioassay, *Podostroma giganteum* was selected from 20 ascomycetes. After culturing this strain with shaking, it was separated into mycelia and supernatant which were extracted and partitioned with organic solvents. Then, the two new compounds **1** and **2** were isolated from the EtOAc-soluble material of the supernatant using bioassay-guided fractionation. The structures of **1** and **2** were elucidated by 2D NMR and MS. Compounds **1** and **2** showed potent enhancing effects on AmB antifungal activity.

Podostroma giganteum, amphotericin B, antifungal activity enhancing effect

講演番号：3F02-02
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:30～ ミーティングルーム F

放線菌 TU14386 株が生産する植物病原菌形態異常誘導物質に関する研究

Studies on the compound inducing abnormal morphological changes on some phytopathogenic fungi produced by actinomycete TU14386.

○畑江 拓斗、大塚 みゆき、堀 浩（玉川大院農）
○Takuto HATAE, Miyuki OTSUKA, Hiroshi HORI (Tamagawa Univ.)

放線菌または糸状菌培養抽出物をコマツナ炭疽病菌 *Colletotrichum destructivum* 胞子に作用させ、何らかの生理活性物質を生産する菌株をスクリーニングした。その結果、放線菌 TU14386 株抽出物がコマツナ炭疽病菌の胞子および菌糸に形態異常を引き起こすことを見出した。本菌株は 16S rDNA 配列解析から *Streptomyces hygroscopicus* と同定した。

次に、活性物質の抽出および精製を試みた。抽出試験および吸着試験の結果から、本活性物質は高極性の酸性化合物であった。続いて各種クロマトグラフィーによる精製を行い、活性物質の単離に成功した。本活性物質は分子量 1472 のペプチド系化合物であり、複数の類縁体が存在することが明らかとなった。

本活性物質は、コマツナ炭疽病菌およびイネごま葉枯れ病菌 *Cochliobolus miyabeanus* に対して胞子発芽管や菌糸の先端を球化膨潤させるポリオキシン様活性を示した。そこで、本化合物の様々な微生物に対する活性を調べ、ポリオキシン B と比較した。本化合物は、ポリオキシンと同様に細菌および酵母に対して活性を示さなかった。一方、活性物質を含むペーパーディスクと対峙させて植物病原菌を培養したところ、同濃度のポリオキシンと比べ、イネごま葉枯れ病菌に対して非常に強い生育阻害活性を示した。

We found actinomycete strain TU14386 by screening program for microorganisms producing bioactive compounds on phytopathogenic fungi. The strain TU14386 produced a compound which induced abnormal morphological changes on the spore and hyphae of *Colletotrichum destructivum*. This strain was identified as *Streptomyces hygroscopicus* based on 16S rDNA sequence.

Extraction and adsorption test showed the active compound was highly polar and acidic. Chromatographic purification of the ingredient gave a pure active compound with some structurally related compounds. Spectroscopic analysis revealed the active compound was a peptide with a molecular weight of 1472.

The active compound showed polyoxin-like activities such as swelling of growing hyphae of some phytopathogenic fungi, but mycelial growth of *Cochliobolus miyabeanus* on agar plate was more strongly inhibited by this compound than polyoxin B.

anti-phytopathogenic agent, secondary metabolite, *Streptomyces hygroscopicus*

講演番号：3F02-03
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:30～ ミーティングルーム F

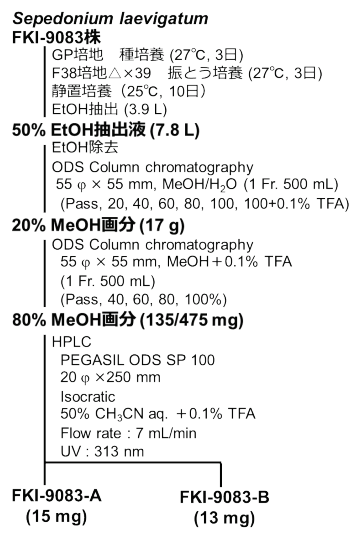
ヘム重合阻害を指標とした微生物代謝産物からの抗マラリア活性物質の探索

Search for antimalarial compounds from microbial metabolites having heme polymerization inhibitory activity

○清水 優希[1]、石山 亜紀[1,2]、小池 李茉[1]、渡邊 善洋[2]、穂苅 玲[2]、肥後 茉由佳[2]、常盤 俊之[2]、稲橋 佑起[1,2]、野中 健一[1,2]、岩月 正人[1,2] ([1]北里大学感染制御科学府、[2]北里大大村研)
○Yuki Shimizu[1], Aki Ishiyama[1,2], Rima Koike[1], Yoshihiro Watanabe[2], Rei Hokari[2], Mayuka Higo[2], Toshiyuki Tokiwa[2], Yuki Inahashi[1,2], Ken Nonaka[1,2], Masato Iwatsuki[1,2] ([1]Grad. Sch. Infection Control Sci., Kitasato Univ., [2]Ōmura Inst., Kitasato Univ.)

マラリアはハマダラカの吸血により媒介される原虫感染症である。マラリア原虫は赤血球内に侵入し分化、増殖する際にヘモグロビンを取り込み食胞で分解することでアミノ酸の供給源としている。ヘモグロビンの分解により遊離するヘムは単量体では原虫に毒性を示すため、ヘムの重合体であるヘモゾインを形成し食胞内に蓄積することで無毒化している。既存薬の chloroquine や amodiaquine はヘムの重合阻害により抗マラリア活性を示すと考えられているが、特に chloroquine に対する薬剤耐性を獲得した熱帯熱マラリア原虫の蔓延が問題となっている。本研究では、ヘム重合阻害活性を指標として微生物培養液から抗マラリア活性物質の探索を行った。

微生物培養液からの探索は、ヘム重合阻害活性を指標としてスクリーニングを行い、LC-UV 解析、菌株の属種から再培養候補株を選定した。再培養により調製したサンプルはヘム重合阻害活性を指標に各種クロマトグフィーで精製を行った。得られた活性物質について NMR、MS 等の機器分析により化学構造を明らかにした。ヘム重合阻害活性を指標として糸状菌由来 1,786 サンプル、放線菌由来 2,034 サンプルをスクリーニングした結果、糸状菌 *Sepedonium laevigatum* FKI-9083 株が選択された。本株の培養液を用いて ODS カラムクロマトグラフィーおよび HPLC 精製により活性物質として FKI-9083-A (15 mg) 及び B (13 mg) を取得した（右図）。各種 NMR、ESI-MS を用いて解析した結果、両物質を新規化合物であると推定した。



Malaria is a protozoan infectious disease caused by *Plasmodium falciparum* and transmitted by blood-sucking mosquitoes. Existing drugs, chloroquine and amodiaquine, are thought to show antimalarial activity by inhibiting heme polymerization. However, the spread of chloroquine-resistant protozoa has been a severe problem worldwide. In this study, we searched new antimalarial compounds having heme polymerization inhibitory activity from microbial cultures.

As a result of screening followed by fermentation and purification, we discovered two new antimalarial agents, FKI-9083-A (13 mg) and B (15 mg), from the cultured broth of a filamentous fungus *Sepedonium laevigatum* FKI-9083 strain.

microbial metabolites, malaria, fungal

発表責任者：岩月正人（iwatuki@lisci.kitasato-u.ac.jp）

講演番号：3F02-04
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:30～ ミーティングルーム F

微生物代謝産物からのマラリア原虫増殖阻害活性物質の探索

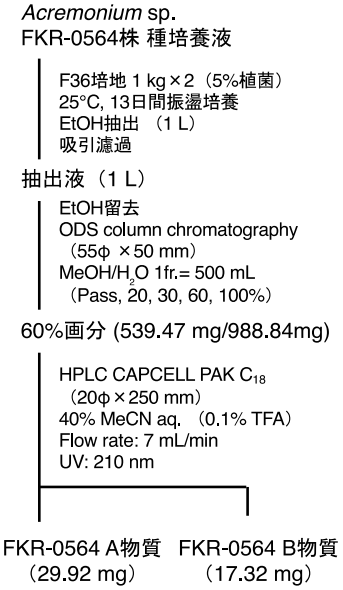
Search for antimalarial compounds from metabolites of microorganisims

○渡邊 善洋[1]、蜂谷 広大[2]、池田 朱里[1,3]、穂苅 玲[1]、石山 亜紀[1,3]、野口 千夏子[1]、村松 玲子[1]、戸澤 美帆[1]、肥後 茉由佳[1]、野中 健一[1,3]、照屋 俊明[4]、石井 貴広[5]、廣瀬 友靖[1,3]、砂塚 敏明[1,3]、岩月 正人[1,3] ([1]北里大院感染制御、[2]北里大 理学部生物科学科、[3]北里大大村研、[4]琉球大教育学部、[5]琉球大農学部)

○Yoshihiro Watanabe[1], Hiromasa Hachiya[2], Akari Ikeda[1,3], Rei Hokari[1], Aki Ishiyama[1,3], Chikako Noguchi[1], reiko Muramatsu[1], Miho Tozawa[1], Mayuka Higo[1], Kenichi Nonaka[1,3], Toshiaki Teruya[4], Takahiro Ishii[5], Tomoyasu Hirose[1,3], Toshiaki Sunazuka[1,3], Masato Iwatsuki[1,3] ([1]Grad. Sch. Infection Control Sci., Kitasato Univ., [2]Department of bioscience, Kitasato University, [3]Omura Inst., Kitasato Univ., [4]Grad. Sch. Faculty of Education, Ryukyu Univ., [5]Faculty of Agriculture Ryukyu Univ.)

マラリアはハマダラカが媒介するマラリア原虫の感染によって引き起こされる原虫感染症である。既存薬としてアルテミシニン等が用いられているが、耐性原虫の出現が報告されていることから新たな作用機序を持つ抗マラリア剤の開発が求められている。そこで演者は赤血球内ステージのマラリア原虫を標的とし、微生物代謝産物から新たな抗マラリア剤のシード化合物を探索した。

多剤耐性マラリア原虫 *Plasmodium falciparum* K1 株の増殖阻害活性を指標にスクリーニングを行い、糸状菌および放線菌の培養物 5,520 サンプルより 156 サンプルが通過した。スクリーニングより選択された沖縄県由来の糸状菌 *Acremonium* sp. FKR-0564 株の培養物よりマラリア原虫増殖阻害活性を示す FKR-0564 A および B 物質を発見した（右図)。1D および 2D-NMR、ESI-MS 解析の結果、両物質を 4 種のアミノ酸残基からなる新規環状ペプチドであると決定した。また、改良マーフィー法および改良モッシャー法による絶対立体構造の決定も行なった。FKR-0564 A および B 物質は *P. falciparum* K1 株に対して強い原虫増殖阻害活性（IC_{50}= 6,812.0 および 450.8 ng/mL）を示した。



Malaria is a protozoan infectious disease caused by *Plasmodium falciparum.* The spread of drug-resistant *P. falciparum* parasites has been reported, and the development of antimalarial agents with new mechanism of action are urgently needed. In this study, we searched new antimalarial agents from microbial metabolites.

As a result of screening, we discovered two new antimalarial cyclic peptides, FKR-0564 A and B from the static culture of a fungus *Acremonium* sp. FKR-0564. Their absolute conformation was determined by the modified Marfey and modified Mosher methods. FKR-0564 A and B showed strong inhibitory activity against *P. falciparum* K1 strain with IC_{50} = 6812.0 and 450.8 ng/mL, respectively.

malaria, fungal, microbial metabolites
発表責任者：渡邊善洋（yosiwata@lisci.kitasato-u.ac.jp）

講演番号：3F02-05
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:30～ ミーティングルーム F

病原真菌 *Aspergillus* 属と免疫細胞の共培養法を用いた休眠遺伝子活性化による新規天然物の探索

Search for new natural products by activating silent genes using co-culture of pathogenic fungi *Aspergillus* species and immune cells

○氏江 優希子[1]、齋藤 駿[1]、矢口 貴志[2]、荒井 緑[1] ([1]慶大理工、[2]千葉大真菌センター)
○Yukiko UJIE[1], Shun SAITO[1], Takashi YAGUCHI[2], Midori ARAI[1] ([1]Keio Univ., [2]MMRC Chiba Univ.)

【背景・目的】

真菌の二次代謝産物生合成遺伝子の大半は休眠状態であり，それを活性化することで新規天然物が得られると考えられている [1)]. 真菌の休眠遺伝子活性化の試みは，プロモーター置換等の遺伝子制御 [2)]，他の微生物との共培養 [3)]などが行われてきた．しかし，依然として普遍的な方法は開発されていないのが現状であり，新規休眠遺伝子活性化法が望まれている．我々のグループは，病原性の放線菌と動物免疫細胞を共培養することで擬似感染状態を作り出すと，休眠遺伝子が活性化され新規天然物が産生されることを見出している [4,5)]. 本研究では，新たな探索資源として，千葉大学真菌医学研究センターが独自に保有する，臨床検体から単離された病原真菌黒色 *Aspergillus* 属と免疫細胞との共培養により，新規天然物の取得を目的とした.

【方法・結果】

これまでに病原真菌黒色*Aspergillus*属6株とマウスマクロファージ様細胞2種の共培養を行い，得られた抽出物をHPLCにより解析した．その結果，共培養特異的に産生が増強された化合物が検出されたため，この化合物の単離について報告する．

【参考文献】

[1] Keller, N. P. *et al.*, *Nat. Rev. Microbiol*. **2005**, *3*, 937-947. **[2]** Chiang, Y. M. *et al*., *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 2965-2970. **[3]** Schroeckh, V. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2009**, *106*, 14558-14563. **[4]** Hara, Y. *et al.*, *Org. Lett.* **2018**, *20*, 5831-5834. **[5]** Hara, Y. *et al.*, *J. Nat. Med.* **2018**, *72*, 280-289.

Most of fungi have a multitude of silent biosynthetic genes. Activating of these silent genes is important for production of new natural products [1)]. Recently, our group designed a co-culture method with pathogenic actinomycete and immune cells to emulate the initial infection state, and obtained new natural products. [4,5)]. In this study, we aimed at getting new natural products by co-culture with immune cells and pathogenic fungi black *Aspergillus* species, isolated from clinical specimens.

Co-culture of 6 strains of black *Aspergillus* and two mouse macrophage-like cells were performed, and the extract was analyzed by HPLC. It revealed that a specific peak was detected under co-culture, after large scale incubation, co-culture specific compound was isolated. In this meeting, we will present the concept of co-culture, isolation and structure elucidation of the compound.

silent gene, co-culture, Aspergillus

発表責任者：荒井　緑（midori_arai@bio.keio.ac.jp）

講演番号：3F02-06
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:30～ ミーティングルーム F

耐熱性放線菌 JA74 株が生産する熱ショック代謝物(HSM)に関する研究

Study of heat shock metabolites (HSM) produced by thermotolerant *Streptomyces* sp. JA74

○船山 佳世[1]、齋藤 駿[1]、加藤 航[1]、新藤 一敏[2]、井本 正哉[3]、荒井 緑[1]([1]慶大理工、[2]日本女子大家政、[3]順天堂大院医)
○Kayo FUNAYAMA[1], Shun SAITO[1], Wataru KATO[1], Kazutoshi SHINDO[2], Masaya IMOTO[3], Midori ARAI[1] ([1]Keio Univ., [2]Japan Women's Univ., [3]Juntendo Univ.)

【背景・目的】

放線菌が生産する二次代謝産物は多彩な構造・生物活性を持ち、これまで多くの医薬品創出に貢献してきた。しかし微生物の二次代謝産物生合成遺伝子の多くは「休眠遺伝子」であり、これらが近年新規化合物の取得を困難にしている。このような背景から共培養[1)2)]や化合物処理[3)]などの刺激を与え、休眠遺伝子を活性化する手法の開発が盛んに行われている。我々は新たな休眠遺伝子活性化手法として“耐熱性放線菌”に着目し、これを高温培養することで通常培養時には生産されない二次代謝産物の存在を見出した。本研究ではこのような高温培養選択的な代謝産物を「**H**eat **S**hock **M**etabolites (HSM)」と命名し、これらの解析を行った。

【方法・結果】

大分県南海部郡の土壌より単離された耐熱性放線菌 JA74 株について、45℃の高温培養と 30℃の通常培養を行い、その抽出液を LCMS 分析したところ、45℃の高温培養特異的に検出される複数の HSM の存在を確認した。そこで JA74 株の大量培養、各種カラムクロマトグラフィーによる分画を行い、JA74-HSM-B を単離・構造決定した。現在は JA74-HSM-B について各種活性評価、合成の検討を進めている。

【参考文献】[1] Hara, Y. *et al., Org. Lett.* **2018**, *20*, 5831-5834. [2] Hara, Y. *et al., J. Nat. Med.* **2018**, *72*, 280-289.
[3] Fisch, K. M. *et al.*, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2009**, *36*, 1199–1213.

Secondary metabolites produced by streptomyces have diverse structures and biological activities, and have made significant contributions to drug development. However, many biosynthetic genes of microorganisms are cryptic, which have made it difficult to obtain new compounds in recent years. Recent studies have attempted to produce secondary metabolites by stimulating gene expression using several methods such as co-culture, drug stimulation. We focused on "Thermotolerant streptomyces" as a new method for activating cryptic genes, and found these streptomyces produced multiple metabolites selectively at high temperature culture. We named these high-temperature culture-selective metabolites "Heat Shock Metabolites (HSM)" and performed these analyses.

Thermotolerant streptomyces JA74 strain was cultured at 45 ℃ and 30 ℃ and these extracts were subjected to LCMS analysis. As a result, we confirmed the existence of multiple HSM. Therefore, JA74 strain was mass-cultured and fractionated by various column chromatography to isolate and determine the structure of JA74-HSM-B. Currently, we are proceeding with evaluation of various activities and synthesis of JA74-HSM-B.

Heat Shock Metabolites (HSM), Thermotolerant streptomyces, cryptic genes

発表責任者：荒井緑（midori_arai@bio.keio.ac.jp）

講演番号：3F02-07
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:30～ ミーティングルーム F

In vitro 解析と X 線結晶構造解析による 2 種の II 型 PKS と FAS における ACP-KS 間特異性制御機構の解明

Elucidation of the mechanism of the specificity between ACP and KS among two type II PKSs and FAS by *in vitro* analysis and X-ray crystallography

○堀内 真展[1]、杜 丹ヤオ[1]、DAVIS Tony D.[2]、BURKART Michael D.[2]、勝山 陽平[1,3]、大西 康夫[1,3] ([1]東大院・農生科・応生工、[2]University of California, San Diego、[3]東大・微生物イノベ連携機構)
○ Masanobu HORIUCHI[1], Danyao DU[1], Tony D. DAVIS[2], Michael D. BURKART[2], Yohei KATSUYAMA[1,3], Yasuo OHNISHI[1,3] ([1]Grad. Sch. of Agric. and Life Sci., The Univ. of Tokyo, [2]University of California, San Diego, [3]CRIIM, The Univ. of Tokyo)

【背景・目的】ポリケタイド合成酵素(PKS)と脂肪酸合成酵素(FAS)は、その触媒機構が類似し、いずれにおいても反応中間体は acyl carrier protein (ACP)に結合した状態で各機能ユニットによる伸長/修飾反応を受ける。II 型システムの場合、各機能は個別のタンパク質が担っているため、ACP と各機能タンパク質間の特異的認識が触媒反応の制御に重要だと考えられる。本研究では PKS/FAS の主要な反応である伸長反応に着目し、ACP と ketosynthase (KS)間の特異性制御機構の解明を目指した。
【方法・結果】放線菌 *Streptomyces* sp. MSC090213JE08 (JE08 株)は FAS に加え、ポリエン系ポリケタイド ishigamide の合成を担う IgaPKS、[1]芳香族ポリケタイド okicenone の合成を担う OkcPKS の計 3 種の II 型システムを有する。このため、各 ACP は自身と同じシステム内の機能タンパク質を高い特異性で認識する機構を持つと考えられる。そこで JE08 株が有する 3 種の II 型 PKS/FAS 由来の ACP と KS の組換えタンパク質(OkcKS はホモログ)を *in vitro* 解析に用いた。KS による ACP 上の中間体の伸長反応はアシル基転移と縮合の 2 段階に分けられるが、各段階における KS の ACP 特異性を複数の方法で調べた結果、ACP 特異性はアシル基転移時は低く、縮合時は高いことが明らかになった。この違いが生じる機構を解明すべく、各段階を模倣する反応機構利用型架橋剤により得られた ACP-KS 複合体の結晶構造解析を行った。その結果、放線菌の FAS では初となる、アシル基転移中間体模倣型と縮合中間体模倣型の ACP-KS 複合体の構造解析に成功した。これら 2 つの構造と過去に報告した II 型 PKS の ACP-KS 複合体構造[1]の比較から ACP-KS 特異性制御機構を考察した。

In the type II system, polyketide synthase (PKS) and fatty acid synthase (FAS) commonly use ACP to synthesize their target products. Since the elongation reaction catalyzed by ketosynthase (KS) is the most important, we aimed to elucidate the mechanism of the specificity between ACP and KS. *Streptomyces* sp. MSC090213JE08 has three type II systems (FAS, IgaPKS and OkcPKS). We analyzed the specificity between ACP and KS from these systems *in vitro*. The elongation reaction is divided into two steps: transacylation and condensation. We revealed that the specificity is low in transacylation and high in condensation. We also solved the crystal structures of FAS's ACP-KS complexes by using two mechanism-based crosslinkers that mimic transacylation and condensation states. The molecular basis of the ACP selectivity of KS will be discussed.
[1] Du, D., Katsuyama, Y., Horiuchi, M. *et al. Nat Chem Biol* **16**, 776–782 (2020)

polyketide synthase, fatty acid synthase, protein-protein interactions

講演番号：3F02-08
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:30～ ミーティングルーム F

放線菌二次代謝における亜硝酸を用いた芳香環アミノ基導入機構の解析

The mechanism of aromatic ring amination using nitrous acid in secondary metabolism of actinobacteria

勝山 陽平[1,2]、○桑原 康[3]、大西 康夫[1,2] ([1]東大院・農生科・応生工、[2]東大・微生物イノベ連携機構、[3]東大農・生命化学工学)
Yohei KATSUYAMA[1,2], ○Ko KUWABARA[3], Yasuo OHNISHI[1,2] ([1]Grad. Sch. of Agric. and Life Sci., The Univ. of Tokyo, [2]CRIIM, The Univ. of Tokyo, [3]Fac. of agric., The Univ. of Tokyo)

芳香環に窒素官能基を直接導入する酵素はこれまで一酸化窒素を用いてチロシンまたはトリプトファンへニトロ基導入を触媒するシトクロム P450 酵素（RufO, TxtE）のみが知られている。しかし亜硝酸を用いて同様の反応を行う酵素の報告は未だない。亜硝酸を用いて芳香環に窒素官能基を導入する酵素が見いだされれば様々な有用物質生産への応用が期待される。nybomycin、streptonigrin、diazaquinomycin はいずれも共通して 3-hydroxyanthranilic acid の 4 位にアミノ基を導入する反応をその生合成に用いると予想されているが、その機構は明らかになっていない。我々はこのアミノ基の導入に亜硝酸が用いられていると予想し、その導入を担う酵素群の解明を目指した。

これら 3 つの化合物の生合成遺伝子クラスターを比較した結果、いずれのクラスターにも亜硝酸生合成経路に関わる *creE*、*creD* ホモログ遺伝子が高い相同性で保存されていた。また、さらに 4 遺伝子が高く保存されていたためこれらが共同してアミノ基の導入を担うと予想した。そこで、deoxynybomycin 生産菌 *である Embleya hyalina* を利用し、これらの機能解析を進めることとした。deoxynybomycin 生合成遺伝子クラスター由来の CreE、CreD ホモログ酵素の組換えタンパク質を大腸菌を用いて調製し、*in vitro* 解析を行った。その結果、アスパラギン酸より亜硝酸が生産されることが確かめられた。また、[^{15}N]亜硝酸ナトリウムを添加した培地で *E. hyalina* を培養し代謝解析を行った結果、亜硝酸が高効率で deoxynybomycin に取り込まれた。以上から、上記の仮説が強く支持された。現在、残りの 4 遺伝子の機能解析を進めている。

No enzymatic system has been reported to achieve amination of an aromatic ring using nitrous acid. Nybomycin, streptonigrin, and diazaquinomycin have been predicted to have a common biosynthetic reaction, introduction of an amino group into 3-hydroxyanthranilic acid at C-4. Comparison of biosynthetic gene clusters of these compounds showed that *creE* and *creD* homolog genes, which are involved in the production of nitrous acid from aspartic acid, are conserved. *In vitro* analysis of recombinant enzymes of the CreE and CreD homologs from the deoxynybomycin biosynthetic gene cluster showed that these enzymes synthesized nitrous acid from aspartate. In addition, feeding of [^{15}N]sodium nitrite into the culture medium of the deoxynybomycin producer *Embleya hyalina* showed that nitrous acid was incorporated into the compound. We also discovered four genes that are also conserved in these three clusters and are studying their functions.

amination, biosynthesis, actinobacteria

講演番号：3F02-09
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:30～ ミーティングルーム F

ヒドラジドを有するアリールポリエン spinamycin の生合成研究

Biosynthesis of spinamycin, an aryl polyene containing a hydrazide group

○川合 誠司[1]、山田 研人[1]、勝山 陽平[1,2]、大西 康夫[1,2]（[1]東大院・農生科・応生工、[2]東大・微生物イノベ連携機構）
○Seiji KAWAI[1], Akito YAMADA[1], Yohei KATSUYAMA[1,2], Yasuo OHNISHI[1,2]（[1]Grad. Sch. of Agric. and Life Sci., The Univ. of Tokyo, [2]CRIIM, The Univ. of Tokyo）

【背景・目的】Spinamycin は放線菌 *Streptomyces albospinus* から単離された、中心の芳香環を挟んでトリエンとヒドラジド構造を有する天然物である。我々の研究室では以前、ジアゾ基含有化合物 cremeomycin の生合成経路より CreE, CreD からなる二次代謝特異的な亜硝酸生合成経路を発見した。[1)] この経路は他の N-N 結合含有化合物の生合成にも用いられており、spinamycin の生合成にも用いられると予想された。過去に、II 型 PKS と *creE, creD* ホモログ融合遺伝子を有する spinamycin (*spi*) 生合成遺伝子クラスターを報告したが、[2)]本研究では *S. albospinus* の遺伝子破壊株の代謝解析や安定同位体標識化合物取り込み実験、*in vitro* 解析などから spinamycin の生合成経路の解明を目指した。
【結果・考察】まず、CRISPER-Cas9 により *creE, creD* ホモログ融合遺伝子である *spiED* の破壊株を作製し、代謝解析を行った。その結果、spinamycin とその誘導体と考えられる化合物の生産が消失した。さらに、^{15}N ラベル化された亜硝酸を *S. albospinus* 野生株の培養液に添加したところ、分子量が 1 増えた spinamycin の分子イオンピークが MS 解析で確認された。これらの結果は、SpiED により形成される亜硝酸が spinamycin のヒドラジド構造に取り込まれることを示唆している。次に、II 型 PKS の carrier protein (SpiA4) と CoA-ligase (SpiA3) の組換えタンパク質を調製し、*in vitro* 反応を行い LC-MS で解析した。その結果、PKS のスターター基質と考えられる 3-aminobenzoic acid が SpiA4 にロードされることが確認された。全生合成経路を解明すべく、現在さらなる実験を継続している。

Spinamycin, a natural product produced by *Streptomyces albospinus*, has hydrazide and triene structures. In our previous study, we found a new nitrous acid biosynthesis pathway for bacterial secondary metabolism in the biosynthesis of a diazo-containing natural product, cremeomycin; CreE and CreD synthesize nitrous acid from aspartic acid via nitrosuccinic acid. This nitrous acid biosynthesis pathway is spread in many actinomycetes and presumably used for the biosynthesis of various N-N bond-containing natural products including spinamycin. To elucidate spinamycin biosynthesis pathway, we constructed a *S. albospinus* Δ*spiED* mutant by CRISPER-Cas9 system. The obtained mutant did not produce spinamycin or its putative derivatives. We also found that one nitrogen atom in the hydrazide structure was ^{15}N-labeled when $^{15}NNO_2$ was added to the culture medium. Furthermore, we conducted *in vitro* analysis of recombinant SpiA3 (CoA-ligase) and SpiA4 (carrier protein), and showed that 3-aminobenzoic acid (a probable starter substrate) was loaded onto SpiA4 by SpiA3.

[1)] Sugai *et al.*, ***Nat. Chem. Biol.*** (2016). [2)] 菅井ら 2015 年度 日本放線菌学会 P-10

biosynthesis, spinamycin, actinomycetes

講演番号：3F02-10
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:30～ ミーティングルーム F

渦鞭毛藻サキシトキシン生合成酵素 SxtA の細胞内局在の解明と *sxtA* 遺伝子解析による無毒化機構の提唱

Intracellular localization of SxtA and a hypothesis for the loss of saxitoxin biosynthesis in a dinoflagellate

○長 由扶子[1]、日出間 志寿[2]、大村 卓朗[3]、小池 一彦[4]、小池 香苗[5]、及川 寛[6]、此木 敬一[1]、大島 泰克[7]、山下 まり[1]([1]東北大院農、[2]福島医大、[3]水圏科学、[4]広大院統合生命、[5]広大 NBARD、[6]水産機構水産技術研、[7]東北大院生命)
○Yuko CHO[1], Shizu Hidema[2], Takuo Omura[3], Kazuhiko Koike[4], Kanae Koike[5], Hiroshi Oikawa[6], Keiichi Konoki[1], Yasukatsu Oshima[7], Mari Yotsu-Yamashita[1] ([1]Tohoku Univ. Agr., [2]Fukushima Med. Univ., [3]LASC, [4]Hiroshima Univ. Integ. Sci. Life, [5]Hiroshima Univ. NBARD, [6]FRA, [7]Tohoku Univ. Life Sci.)

【背景・目的】サキシトキシン（STX）に代表される麻痺性貝毒は電位依存性ナトリウムチャネル阻害活性を有する。渦鞭毛藻によって生産された毒を二枚貝が蓄積し、その貝を喫食したヒトは麻痺性の食中毒症状を示し、重篤な場合には死に至る。麻痺性貝毒生合成については藍藻からの生合成遺伝子クラスターの同定により大いに進展した。藍藻における STX 生合成に関与する 21 遺伝子のうち 14 遺伝子が渦鞭毛藻からも同定されたこと、生合成初期の中間体が両生物種から検出されていることなどから、両生物では同じ前駆体から同様な経路で生合成されることが示唆されている。近年の有毒渦鞭毛藻ブルーム発生海域の世界的拡大により、毒生合成制御メカニズム解明の必要性が高まっているが、渦鞭毛藻については依然として不明な点が多く残されている。本研究は渦鞭毛藻における STX 生合成初発反応オルガネラの特定と、無毒株における無毒化の原因解明を目的とした。
【方法及び結果】STX 生合成の初発の反応を司る SxtA のペプチド抗体を作成し、免疫染色により渦鞭毛藻有毒種 3 種の細胞内にオルガネラ局在シグナルを検出した。2 種の無毒種には検出されないことを確認した。Rubisco II 抗体との多重染色及び免疫電顕により SxtA は葉緑体に局在していることを明らかにした。*A. tamarense* 無毒株は有毒株と同程度のコピー数の *sxtA* 遺伝子を有するが、mRNA 及びタンパク質発現レベルが著しく低下していた。3'-RACE による *sxtA* の mRNA 塩基配列解析から 3' 非翻訳領域における変異が生合成能の低下をもたらしていることが示唆された。

SxtA is the enzyme that catalyses the first step of saxitoxin biosynthesis. We developed an immunofluorescent method to detect SxtA using antibodies against SxtA peptides. The presence of abundant, sub-cellularly localized signal was revealed in cells of toxic species and its absence in non-toxic species by confocal microscopy. The association of SxtA with chloroplasts was strongly suggested by co-localization of SxtA with Rubisco II and ultra-structural observation by transmission electron microscopy. We also characterized a non-toxic sub-clone of *A. tamarense* to elucidate the mutation responsible for its loss of toxicity. Expression levels of mRNA and protein were significantly reduced in the non-toxic sub-clone, although *sxtA4* gene copy number was indistinguishable in toxic and non-toxic sub-clones, and we found sequence variation at the 3' untranslated region (3'UTR) of *sxtA4* mRNA. Differences in the *sxtA4* mRNA 3'UTR may lead to down-regulation of STX biosynthesis and cause the differences in toxicity among different *A. tamarense* sub-clones.

saxitoxin, biosynthesis, chloroplast

発表責任者：長　由扶子（yuko.cho.a4@tohoku.ac.jp）

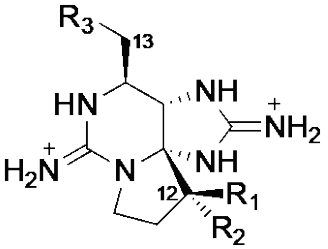
講演番号：3F02-11
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:30～ ミーティングルーム F

麻痺性貝毒サキシトキシンの推定生合成中間体の合成と有毒渦鞭毛藻中における同定

Synthesis of a predicted biosynthetic intermediate of paralytic shellfish toxin, saxitoxin, and its identification in the toxic dinoflagellates

○東海林 千容[1]、長 由扶子[1]、安達 栞菜[2]、石塚 颯[2]、此木 敬一[1]、及川 寛[3]、小池 一彦[4]、長澤 和夫[2]、山下 まり[1]([1]東北大院農、[2]東農工大院工、[3]水産機構水産技術研、[4]広大院統合生命)
○Chihiro Tokairin[1], Yuko Cho[1], Kanna Adachi[2], Hayate Ishizuka[2], Keiichi Konoki[1], Hiroshi Oikawa[3], Kazuhiko Koike[4], Kazuo Nagasawa[2], Mari Yotsu-Yamashita[1] ([1]Tohoku Univ. Agr., [2]Tokyo Univ. of Agri & Tech., [3]FRA, [4]Hiroshima Univ. Integ. Sci. Life)

[背景・目的] サキシトキシン(saxitoxin, STX, **1**)は、麻痺性貝毒(PSTs)の代表的化合物であり、強力な電位依存性ナトリウムチャネルの阻害剤である。PSTs は、海産渦鞭毛藻や淡水産の藍藻によって生産され、海洋では二枚貝に蓄積し、食中毒の原因となる。その生合成経路は、有毒藍藻から発見された生合成遺伝子配列により、L-アルギニンを出発物質とした経路が推定された。一部の類似の遺伝子は、有毒渦鞭毛藻からも同定された。我々は、推定生合成中間体を化学合成し、有毒藍藻や渦鞭毛藻中に存在することを証明した。[1,2] また、Narayan らは数種の生合成遺伝子を異種発現し、基質特異性から酸化の順番を提唱した。[3]しかし、三環形成や多段階の酸化過程には未解明な点が多い。本研究では、STX 生合成の環化や酸化の順序についての情報を得る目的で、昨年度に引き続き、推定生合成中間体 12, 12, 13-trideoxy-dcSTX (**2**)を化学合成し、PST 生産渦鞭毛藻中の存在を調べた。



STX (**1**) R_1, R_2=OH, R_3=$OCONH_2$
2 R_1, R_2, R_3=H

[方法]長澤らの dcSTX の合成中間体[4]を、Barton-McCombie 反応によって脱酸素化し、脱保護後の生成物の精製方法を改善して、**2** を得た。また、昨年とは異なる時期に収穫した有毒渦鞭毛藻 *Alexandrium pacificum* (120518KureAC 株)および *Gymnodinium catenatum* (GC-18 株)の培養藻体粗精製物を調製し、HILIC および逆相 LC による HR-LC-MS または HR-LC-MS/MS で分析した。

[結果] 分析した両方の渦鞭毛藻株から HR-HILIC-MS/MS で、保持時間、精密分子量、MS/MS パターンが、合成 **2** と一致するピークが得られた。また、*G. catenatum* の **2** は、比較的量が多く逆相 HR-LC-MS でも確認できた。これらの結果から、三環形成後に酸化が進行する可能性も示された。

Saxitoxin is the representative toxin of paralytic shellfish toxins (PSTs), which are potent voltage-gated sodium channels blockers. We have been studying biosynthetic pathway towards PSTs based on identification of the predicted intermediates in the toxin-producing microorganisms using the chemically synthesized compounds and HR-LC-MS. In this study, 12, 12, 13-trideoxy-dcSTX was chemically synthesized and identified this compound in two toxic dinoflagellate strains. The result suggests possible reaction order in oxidation process.

[Reference] 1) Tsuchiya, S.; Cho, Y.; Konoki, K.; Nagasawa, K.; Oshima, Y.; Yotsu-Yamashita, M. *Sci. Rep.*, **2016**, 6:20340. 2) Tsuchiya, S.; Cho, Y.; Yoshioka, R.; Konoki, K.; Nagasawa, K.; Oshima, Y.; Yotsu-Yamashita, M. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2017**, 56, 5327–5331. 3) Lukowski, A. L.; Ellinwood, D. C.; Hinze, M. E.; De Luca, R. J.; Du Bois, J.; Hall, S.; Narayan, A. R. H. *J. Am. Chem. Soc.*, **2018**, 140, 11863–11869. 4) Iwamoto, O.; Nagasawa, K. *Org. Lett.* **2010**, 12, 2150–2153.

saxitoxin, paralytic shellfish toxins, biosynthesis

発表責任者：山下まり（mari.yamashita.c1@tohoku.ac.jp）

講演番号：3F02-12
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:30～ ミーティングルーム F

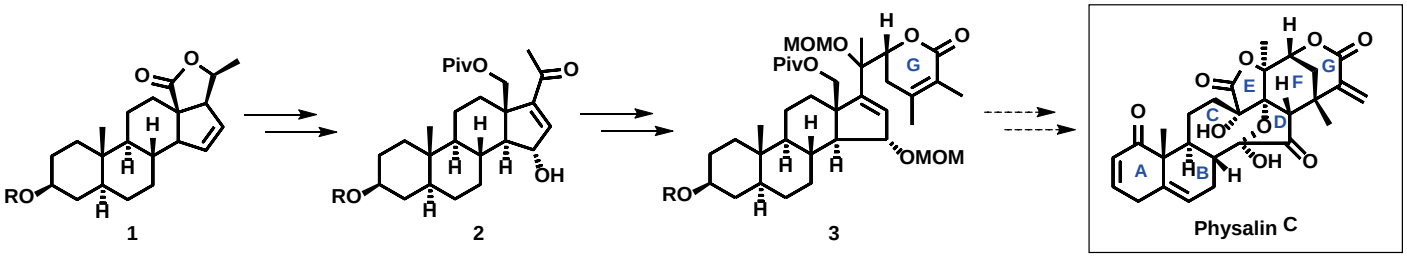
ステロイド系天然物 Physalin 類の合成研究

Synthetic studies on Physalins

○新木 悠介、中崎 敦夫、西川 俊夫 (名大院生命農)
○Yusuke ARAKI, Atsuo NAKAZAKI, Toshio NISHIKAWA (Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University)

フィサリン（Physalin）はナス科植物・ホオズキより苦味成分として単離されたステロイド系天然物である。その構造は、ステロイド C13-14 結合が開裂してできる炭素九員環と高度に酸化された CDE 環を持ち、ステロイド C16 と側鎖 C24 に新しい炭素炭素結合が形成されている他に類を見ない複雑なものである。この複雑な構造のため、構造決定から約 50 年が過ぎた今日でもフィサリンの全合成は報告されていない。我々は、フィサリンの生合成経路を推定し、これを模倣することでフィサリンの世界初の全合成を達成することを目的として研究を行っている。

昨年度の本大会では、モデル実験としてステロイド C13-14 結合を切断しフィサリンの特異な CDE 環構造を構築したことを報告した。この結果を受け、文献既知の化合物 **1** から **2** を経てフィサリンの G 環に相当する δ ラクトンを側鎖にもつステロイド化合物 **3** を合成した。現在、**3** からフィサリンへの変換を検討中である。



Physalins were steroidal natural products isolated as major bitter constituents from *Physalis Alkekengi var Francheti*. The total synthesis of physalins has never been reported yet although fifty years after the structure elucidation, due to the vey complex structure such as 13,14-seco steroids (9 membered carbocycle derived from steroidal CD ring) which is fused with a 6 membered ring (F ring) embedded with δ-lactone (G ring). We propose a biosynthetic pathway and embarked synthetic study towards total synthesis according to the proposal. At the previous JSBBA annual meeting, we reported the construction of CDE ring moiety as a model experiment. Based on this result, compound **3** which has δ-lactone (G ring) was synthesized from known compound **1**. Efforts to physalin from **3** will be presented.

Natural product synthesis, Steroids, Radiral reaction

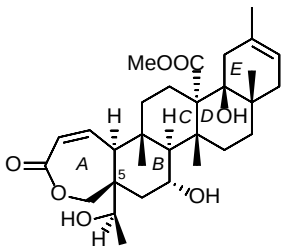
講演番号：3F02-13
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:30～ ミーティングルーム F

ノルトリテルペノイドの A 環部分の構築

Construction of A-ring of nortriterpenoids

○多湖 光佑、西川 俊夫、中崎 敦夫 (名大院生命農)
○Kosuke Tago, Toshio Nishikawa, Atsuo Nakazaki (Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University)

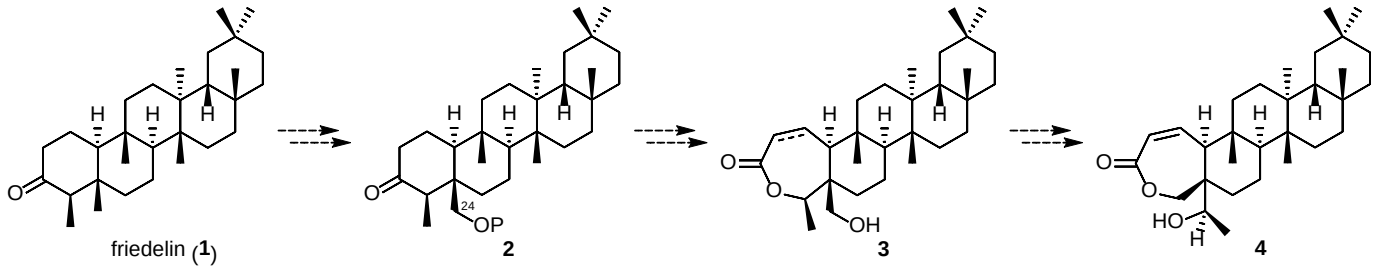
トリテルペノイドには重要な医薬品資源となる化合物が多数報告されている。例えば、ノルトリテルペノイドの一つである galphimine B は抗不安薬のリード化合物として期待されている。これまでに、galphimine 類と共通する A 環を持つ類縁体が多数報告されている。その構造的特徴として、核間の 5 位に置換したヒドロキシエチル基と 7 員環のα,β-不飽和ラクトンが挙げられるが、本骨格の構築法は報告されていない。そこで本研究では、friedelin (**1**) をモデル基質として用いて核間位の置換基も含めた A 環の構築を目指し研究を開始した。



galphimine B

Friedelin (**1**) から、24 位にヒドロキシ基が導入されたケトン **2** へと変換し、Baeyer-Villiger 酸化を経て **3** を合成する。その後、分子内エステル交換を行って **4** を得る計画である。講演時には、各変換反応の詳細を議論する。

Triterpenoids are known as an important potential medical source. For example, galphimine B is a kind of nortriterpenoids and expected to be lead compounds for an anxiolytic. Also, many analogs having galphimine like A-ring were reported. Its structural features are an angular hydroxyethyl group at C5 position and α,β-unsaturated 7-membered lactone in A-ring. However, a method of the construction of the A-ring system has not been developed yet. Therefore, we planned to construct the A-ring system including the angular substituent using friedelin (**1**) as a model substrate. We envisaged that ketone **2** bearing 24-hydroxy group would be converted into 7-membered lactone **3** and that subsequent transesterification could afford **4**. In this presentation, details of each reaction will be disclosed.



nortriterpenoid, 7-membered lactone, intramolecular transesterification

発表責任者：多湖　光佑（tago.kosuke@b.mbox.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：3F02-14
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:30～ ミーティングルーム F

バラの重要香気成分である DAMASCENOLIDE の類縁体合成と香気特性（第 2 報）

Analog synthesis of DAMASCENOLIDE, an important aroma component of roses, and their aroma characteristics (Part 2)

○宮澤 和[1,2]、川口 賢二[1]、勝田 亮[2]、額田 恭郎[2]、石神 健[2]（[1]長谷川香料（株）、[2]東農大・生命）
○ Yamato MIYAZAWA[1,2], Kenji KAWAGUCHI[1], Ryo KATSUTA[2], Tomoo NUKADA[2], Ken ISHIGAMI[2] ([1]T. Hasegawa Co., Ltd., [2]Tokyo Univ. of Agriculture)

我々はバラ (*Rosa damascena*) の重要香気成分としてシトラス様香気を有する DAMASCENOLIDE® [**1**, 4-(4-methylpent-3-en-1-yl)furan-2(5*H*)-one] を見出したことを報告している。これまでの研究により化合物 **1** は「バラに天然感を付与する効果」などを有する優れた香料化合物であることがわかっているが、より有用な香料化合物の開発を目的とし化合物 **1** の類縁体に関する研究を行っている。

2020 年度大会では化合物 **1** の二重結合に関する類縁体計 16 種の合成と香気特性について発表した。我々は次の標的化合物として Figure 1 に示す計 11 種の類縁体を選定した。化合物 **2~6** はフラノン環をメチル化またはジメチル化した類縁体、化合物 **7~12** は側鎖に関する類縁体である。本講演ではこれらの合成と香気特性、さらには構造と香気の相関について得られた知見を発表する。

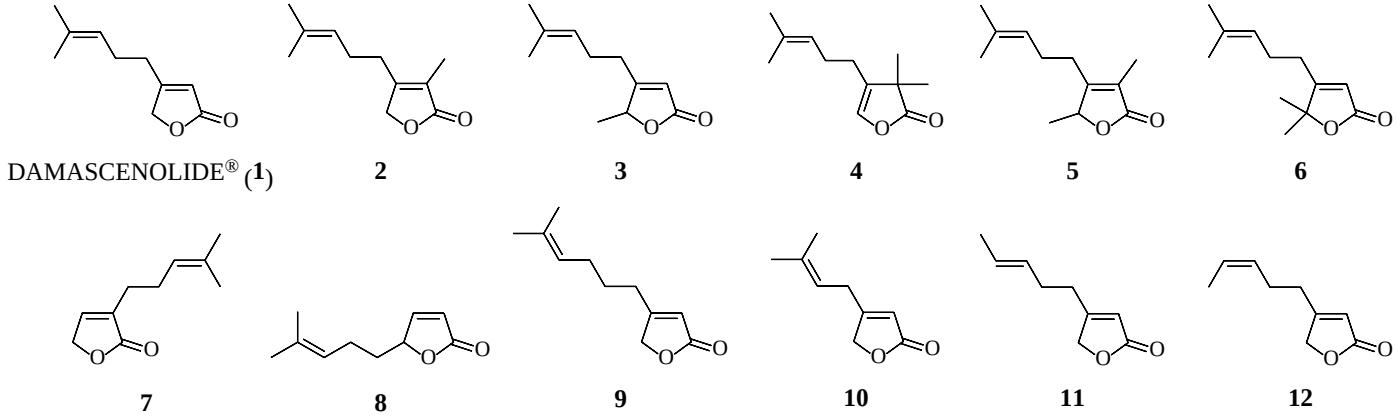


Figure 1. DAMASCENOLIDE® (**1**) と標的化合物 **2~12** の構造

DAMASCENOLIDE® [**1**, 4-(4-methylpent-3-en-1-yl)furan-2(5*H*)-one], which has a citrus-like odor, is an important aroma component of roses (*Rosa damascena*). For the purpose of developing more useful aroma compounds, we are developing research on analogs of **1**.

At the 2020 annual meeting, we reported the synthesis and odor evaluation of sixteen analogs related to the double bond. At this meeting, the synthesis and odor evaluation of eleven more analogs (methylated analogs, dimethylated analogs and analogs with modified side chain) as shown in Figure 1 will be reported. The findings on structure-odor relationships will also be presented.

DAMASCENOLIDE, analog synthesis, structure-odor relationships

発表責任者：宮澤　和（yamato_miyazawa@t-hasegawa.co.jp）

講演番号：3F02-15
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:30～ ミーティングルーム F

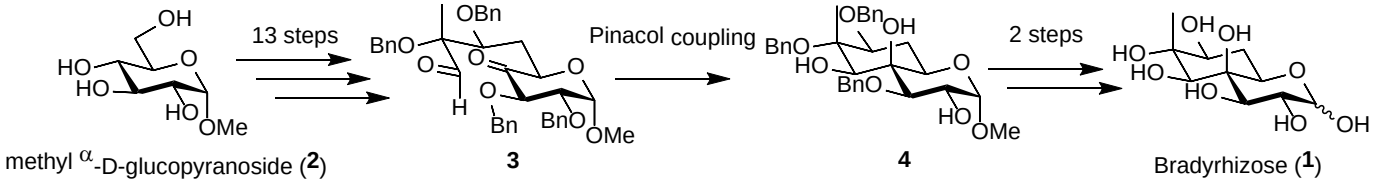
炭素環構造を持つユニークな糖 Bradyrhizose の合成研究

Synthetic Studies of Bradyrhizose, a Unique Carbocyclic Monosaccharide

○伊東 祐太朗、今野 寛之、松島 芳隆（東京農業大学・農芸化学化）
○Yutaro ITO, Hiroyuki KONNO, Yoshitaka MATSUSHIMA (Tokyo Univ. of Agriculture, Dept. of Agricultural Chemistry)

【背景・目的】Bradyrhizose (**1**)は、2007 年に発見されたマメ科植物 *Aeschynomene indica*（クサネム）に共生する植物根粒菌 *Bradyrhizobium sp.*（BTAi1 株および ORS278 株）の細胞壁多糖から単離された新規の糖であり [1)]、その機能はほとんど不明である。全合成に関しては 3 例報告があるが [2)]、本研究では分子内 pinacol coupling を鍵反応とした Bradyrhizose の短工程でより効率的な合成ルートの確立を行うことを目的とする。

【方法・結果】安価に入手可能な methyl α-D-glucopyranoside (**2**)を出発物質とし、Sharpless の不斉ジヒドロキシ化を含む 13 工程でケトアルデヒド **3** へと変換した [3)]。今回ケトアルデヒド **3** に対して pinacol coupling を行い、環化体のジオール **4** の合成に成功した。今後はアセタールの加水分解と Bn 基の脱保護を行うことで Bradyrhizose (**1**)の合成を完了する予定である。反応の詳細について報告する。



Bradyrhizose is a novel carbocyclic monosaccharide isolated from the lipopolysaccharide O-antigen side chain of *Bradyrhizobium* species (BTAil and ORS278 strains) in 2007. For the efficient synthesis of bradyrhizose, we planned a synthesis of bradyrhizose via intramolecular pinacol coupling as a key reaction. We have achieved a synthesis of ketoaldehyde **3** from commercially available methyl α-D-glucopyranoside (**2**) in 13 steps. Next, diol **4** was successfully obtained by intramolecular pinacol coupling reaction. Further transformation to bradyrhizose (**1**) are currently ongoing.

1) A. Silipo *et al. Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 12610-12612.
2a) B. Yu *et al*. *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 6964-6967.
2b) T. L. Lowary *et al*., *J. Org. Chem.* **2019**, *84*, 14-41.
2c) D. Crich *et al*. *Org. Lett.*, **2020**, *22*, 523-527.
3) 今野寛之，松島芳隆 日本農芸化学会 2017 年度大会 2C12p05

carbocyclic monosaccharide, bradyrhizose, pinacol coupling

発表責任者：松島芳隆（ym205308@nodai.ac.jp）

講演番号：3F02-16
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:30～ ミーティングルーム F

Schiff 塩基型キラル Ni 錯体を用いた光学活性アミノ酸類の合成研究

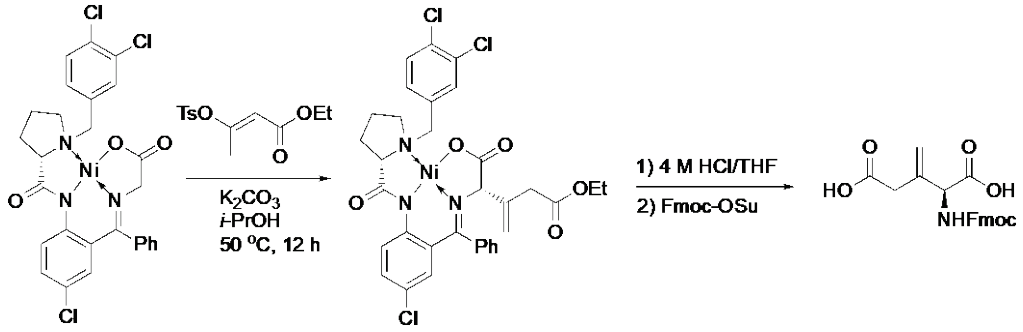
Synthetic study of tailor made amino acids by chiral Schiff base Ni(II)-complex

○今野 博行[1]、茂野 優平[1]、中野 有那[1]、長岡 敬太[1]、Jianlin Han[2]、森脇 浩樹[3]、Vadim Soloshonok[4]
([1]山形大院理工、[2]南京森林大、[3]浜理薬品、[4]バスク大)
○Hiroyuki KONNO[1], Yuhei SHIGENO[1], Arina NAKANO[1], Keita NAGAOKA[1], Han Jianlin[2], Hiroki MORIWAKI[3], Soloshonok Vadim[4] ([1]Yamagata Univ., [2]Nanjing Forestry Univ., [3]Hamari Chemical, [4]University of Basque Country)

プロリンとグリシンから容易に調製可能な Schiff 塩基型キラル Ni 錯体は塩基性条件下、グリシンα位がアルキル化、マイケル付加反応などを起こし、立体選択的なα-アミノ酸型誘導体を生成する。特に Schiff 塩基型キラル Ni 錯体に配置されたジクロロベンゼンとクロロベンゼンはスタッキングを起こすことが知られ、立体制御をより厳密なものにしている。今回演者らは、新規性の高いアミノ酸類の合成を検討したので報告する。

まず初めにキラル Ni 錯体とビニルトシラートの反応を検討した。様々な条件を検討した結果、塩基には炭酸カリウム、溶媒にはイソプロパノールを用いた時に反応が効率的に進行することを見出した。そこで様々なビニルトシラートやα, β-不飽和エステルで本反応を行なってみたところ、β-トシル-α, β-不飽和エステルを用いた時のみ二重結合が異性化したエキソメチレンを構造に持つ Ni 錯体が得られることがわかった。この錯体を酸処理による分解反応を施すことで新規性の高い Fmoc-アミノ酸を得ることができた。この時、光学純度の低下や二重結合の異性化は全く見受けられなかった。本方法論を用いていくつかの光学活性アミノ酸の入手にも成功した。その詳細について報告する。

We report the synthesis of 3-methyleneglutamic acid via a tandem Michael addition-elimination reaction between nucleophilic glycine equivalent and enol tosylates. Optimized conditions were found to be *E*-enol tosylate (1.5 eq.)/K_2CO_3 (10 eq.)/*i*-PrOH at 50 ºC for 12 h; which give desired Ni(II)-complexe in 91% chemical yield and high diastereoselectivity (>99:1). Disassembly of Ni(II)-complex and isolation of the target amino acid as the Fmoc-derivative. We will report the preparation of several amino acids using this methodology.



Tailor made amino acid, chiral Schiff base Ni(II)-complex, vinyl tosylate

発表責任者：今野博行（konno@yz.yamagata-u.ac.jp）

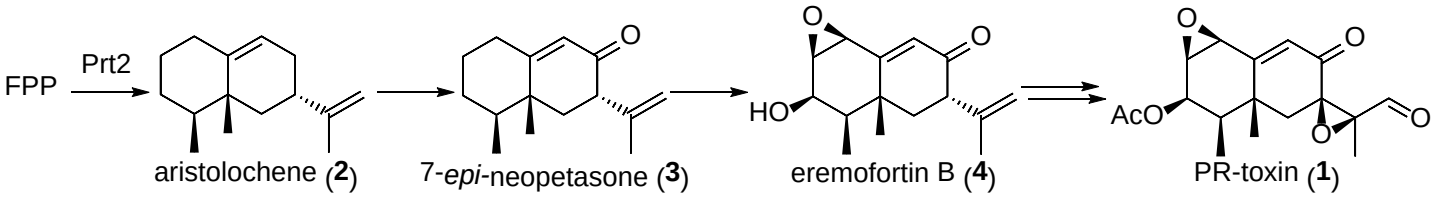
講演番号：3F04-01
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:30～ ミーティングルーム F

麹菌異種発現を用いた PR-toxin の生合成研究-2-

Biosynthetic study of PR-toxin by utilizing *Aspergillus oryzae* system (2)

○佐藤 芳郎、瀧野 純矢、尾﨑 太郎、劉 成偉、南 篤志、及川 英秋（北大院理）
○Yoshiro Sato, Junya Takino, Taro Ozaki, Chengwei Liu, Atsushi Minami, Hideaki Oikawa (Graduate School of science, Hokkaido University)

【背景・目的】PR-toxin (**1**) は、1973 年に青かび *Penicillium roqueforti* から単離されたエレモフィラン系のセスキテルペンであり、RNA 転写阻害活性を示すことなどが知られている。環化酵素 (Prt2) が FPP から aristolochene (**2**) を生成することや遺伝子クラスター[1] (*prt*1-11) の同定が行われているものの、**2** に対する修飾反応に関しては未解明である。本研究では、ゲノム編集 (Hot-spot Knock-in) を用いて麹菌の高発現領域に遺伝子を確実に導入することで、修飾酵素の機能解析を試みた。
【結果】**1** の遺伝子クラスターに存在する機能未知酵素と転写制御因子を除いた 9 遺伝子を麹菌の高発現領域[2] (HS801, 201, 401, 601) に導入したところ、**1** の構造類縁体である **4** とそのアセチル化体の生産が観測された。また、導入する遺伝子の組み合わせを変えた異種生産や単独遺伝子導入株を用いた微生物変換を行うことで、**4** は **2** から **3** を経由して生合成されることを明らかにした。
現在、**4** 以降の側鎖の修飾反応に関しても検討しており、その結果も報告する予定である。



PR-toxin, isolated from *Penicillium roqueforti,* is an eremophilane-type sesquiterpene exhibiting an inhibition activity against critical cellular processes including transcription and protein biosynthesis. *P. roqueforti* also produces structurally related sesquiterpenes such as eremofortin A and B, suggesting that they are biosynthetic intermediates of PR-toxin. Previous functional analysis revealed that Prt2 is a sesquiterpene synthase to give **2** as a putative biosynthetic intermediate. However, modification reactions leading to **1** remains unclear. Here, we examined a reconstitution of the biosynthetic pathway for **1** using recently established genome-editing technique for the expression host *Aspergillus oryzae*. Heterologous expression and biotransformation experiments revealed that **4** is constructed from **2** via **3**. Details will be discussed in our presentation.

【参考文献】

1, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **2017**, *101*, 2043-2056.
2, *J. Am. Chem. Soc.*, **2019**, *141*, 15519-15523.

biosynthesis, sesquiterpene, CRISPR/Cas9 genome editing

講演番号：3F04-02
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:30～ ミーティングルーム F

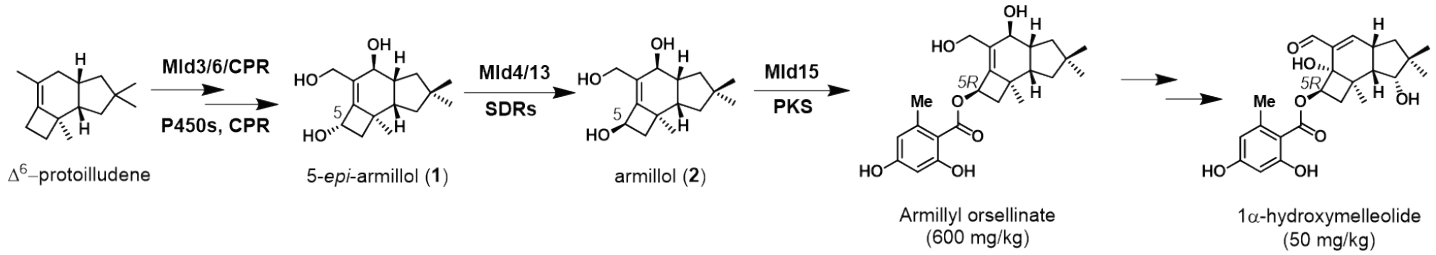
担子菌由来抗腫瘍物質 melleolide の全生合成

Total biosynthesis of the basidiomycete derived antitumor substance meleolide

○尾関 美衣菜[1]、長嶺 翔太[1]、尾﨑 太郎[1]、河岸 洋和[2]、丸山 潤一[3]、南 篤志[1]、及川 英秋[1]([1]北大院理、[2]静大グリーン研、[3]東大院農生科)
○ Miina OZEKI[1], Shota NAGAMINE[1], Taro OZAKI[1], Hirokazu KAWAGISHI[2], Jyunichi MARUYAMA[3], Atsushi MINAMI[1], Hideaki OIKAWA[1] ([1]Hokkaido Univ., [2]Shizuoka Univ., [3]Tokyo Univ.)

Melleolide は、担子菌 *Armillaria mellea* が生産する二次代謝産物であり、抗腫瘍・抗菌・抗真菌などの様々な生物活性を示す。4/5/6 員環が縮合した protoilludane (PI) 型セスキテルペンを基本骨格としたオルセリン酸エステル（OA）の総称で、70 以上の類縁体が知られる構造多様な化合物群である。PI を基本骨格とする担子菌由来セスキテルペンの生合成経路解明は未だ達成されていないため、本研究では、melleolide の生合成経路の完全解明および異種生産を目的として研究を行った。

Melleolide の生合成遺伝子クラスターを構成する 15 遺伝子（*mld1-15*）のうち、Δ^6-protoilludene 合成酵素遺伝子 *mld5* (*pro1*) [1)]、2 種のシトクロム P450 遺伝子・*mld3/6* [2)] をシトクロム P450 還元酵素遺伝子 (*cpr*) とともに発現宿主である麹菌内で異種発現すると、天然物とは異なる 5S 体のトリオール 5-*epi*-armillol (**1**) が得られた。さらに、異種発現及び酵素反応の解析から、**1** が二種の酸化還元酵素 Mld4 と Mld13 による酸化、還元を経て、天然物と同じ 5R 体 armillol (**2**) へと変換されることを明らかにした。**2** を生産する形質転換体において、OA の合成およびアシル化を触媒するポリケチド合成酵素 Mld15[3)]、および残りの候補遺伝子を共発現したところ、天然物として知られる 2 種のメレオライド類縁体の異種生産に成功した。1) B. Engels *et al. J. Biol.Chem.* **2011**, *286*, 6871. 2) S. Jennewein *et al.* WO 2015/104051 A1. 3) G. Lackner *et al*. *Chem.Biol.* **2013**, 20, 1101.



Melleolides are bioactive natural products produced by basidiomycete *Armillaria mellea*. Chemically, they are composed of a tricyclic protoilludane-type sesquiterpene alcohol which is esterified with orsellinic acid or its derivatives. To elucidate the biosynthetic pathway and achieve the total biosynthesis of melleolide, we examined the heterologous expression of the biosynthetic genes in the host strain *Aspergillus oryzae*. By expressing the terpene synthase with cytochrome P450s and short-chain dehydrogenase/reductases with different combinations, we unveiled the biosynthetic pathway for a key intermediate armillol. In addition, heterologous production of two melleolides was achieved by the co-expression of the polyketide synthase.

Biosynthesis, Sesquiterpene, Basidiomycete

発表責任者：尾関　美衣菜（ggcake127@eis.hokudai.ac.jp）

講演番号：3F04-03
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:30～ ミーティングルーム F

特徴的な繰り返し構造を持つ phialotide の生合成研究 (1)

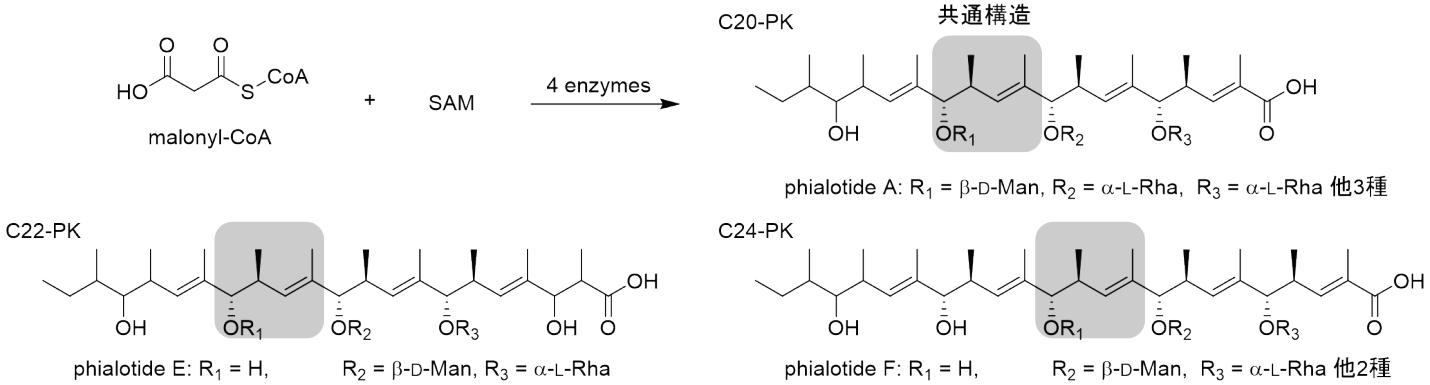
Biosynthetic study of phialotides (1)

○瀧野 純矢、小谷 明里、尾﨑 太郎、南 篤志、及川 英秋 (北大院理)
○Junya TAKINO, Akari KOTANI, Taro OZAKI, Atsushi MINAMI, Hideaki OIKAWA (Hokkaido Univ. Fac. of Sci.)

【目的・背景】Phialotide 類は、真菌 *Pseudophialophora* sp. BF-0158 から単離された、臨床薬アムホテリシン B の活性増強物質である。これらは鎖長の異なる 3 種のポリケタイド骨格 (C20-PK, C22-PK, C24-PK)に 1-3 個のマンノースあるいはラムノースが結合した 8 種の構造が報告されている (下図)[1]。アグリコン部の構造に着目すると、糸状菌由来のポリケタイドには珍しいオキシメチンを含む繰り返し構造を有している。今回、Phialotide 類の生合成機構を解明するため、生合成遺伝子クラスターを探索し、異宿主生産を行った。

【方法・結果】BF-0158 株のゲノム解析を行い、HR-PKS をクエリとしたローカル BLAST 検索の結果、繰り返し型ポリケタイド合成酵素 (HR-PKS)と trans-エノイル還元酵素 (t-ER)を含む推定生合成遺伝子クラスターを見出した。今回クラスター中の 4 遺伝子を麹菌で異種発現したところ、C20-PK と C24-PK の生産を確認できた。また、これら PK の生産比が培地の組成によって変わる興味深い実験結果が得られた。現在、phialotide の絶対立体配置を解明すべく検討を行っており、その結果も報告する予定である。

参考文献:[1] A. Yagi, R. Uchida, K. Kobayashi, H. Tomoda, *J. Antibiot.* **2020**, *73,* 211-223.



Polyketide glycosides phialotides A-H are reported as new potentiators of amphotericin B activity. The polyketide chain has unique repeating substructure flanked by oxymethine carbon. Genome sequence analysis allowed us to identify the putative biosynthetic gene cluster possessing a HR-PKS gene, a trans-ER gene, and other modification enzyme genes. Here we report functional characterization of each genes by heterologous expression using *Aspergillus oryzae*.

Phialotides, biosynthesis, heterologous expression

講演番号：3F04-04
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:30～ ミーティングルーム F

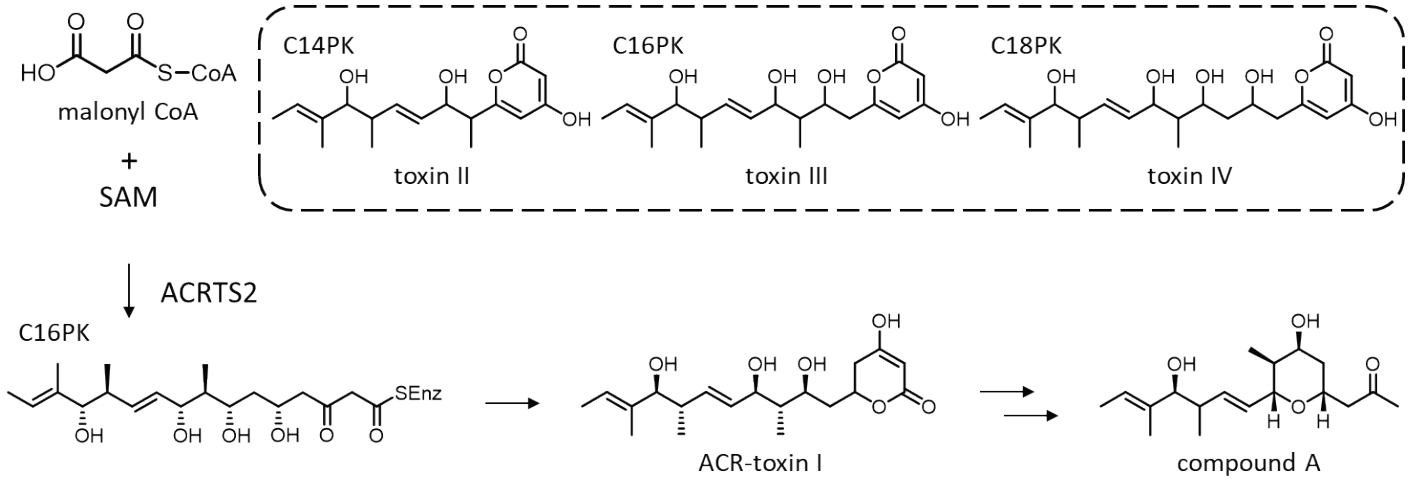
カンキツ brown spot 病菌由来宿主特異的毒素 ACR-toxin の生合成

Study on the biosynthesis of host-selective toxin ACR-toxin derived from citrus brown spot disease

○小谷 明里[1]、瀧野 純矢[1]、尾﨑 太郎[1]、望月 進[2]、秋光 和也[2]、南 篤志[1]、及川 英秋[1]([1]北大院理、[2]香川大農)
○Akari KOTANI[1], Junya TAKINO[1], Taro OZAKI[1], Susumu MOCHIZUKI[2], Kazuya AKIMITSU[2], Atsushi MINAMI[1], Hideaki OIKAWA[1] ([1]Fac. Sci., Hokkaido Univ., [2]Fac. Agric., Kagawa Univ.)

宿主特異的毒素 ACR-toxin は真菌 *Alternaria citri* から単離されたポリケタイドであり、ラフレモンに brown spot を起こす。ACR-toxin には、主要成分である ACR-toxin I 以外に、鎖長の異なる 3 種のポリケタイド骨格（C14PK, C16PK, C18PK）の類縁体が報告されている（下図）[1][2]。2012 年にポリケタイド合成酵素（PKS）遺伝子である *ACRTS2* がクローニングされ、ACR-toxin の生合成に関わることが示された[3]。本研究では、PKS による骨格構築機構の解明を目的として研究を行った。*ACRTS2* を麹菌で異種発現したところ、形質転換体が ACR-toxin の分解生成物として報告されている compound A を生産した。また、他にも関連化合物が得られており、現在構造解析を行ったので報告する。。

参考文献：[1] J. M. Gardner *et al., Phytochemistry* **1985**, 24, 2861-2867, [2] Y. Kono *et al., Phytochemistry* **1985**, 24, 2869-2814, [3] Y. Izumi *et al., Mol. Plant-Microbe Interact.* **2012**, 25, 1419-1429



ACR-toxin is a host selective toxin isolated from fungal phytopathogen *Alternaria citri*, which causes spot disease against rough lemons. In the previous study, *ACRTS2*, a polyketide synthase (PKS) gene, was cloned from the producing strain. although gene disruption and RNA-silencing analysis showed that this gene is involved in the biosynthesis, the pathway leading to ACR-toxin was not fully elucidated. In this study, we conducted the expression of *ACRTS2* in the heterologous host *Aspergillus oryzae*. We confirmed the resultant transformants produced ACR-toxin and its related metabolites.

Biosynthesis, Aspergillus oryzae, Polyketide

発表責任者：及川英秋（hoik@sci.hokudai.ac.jp）

講演番号：3F04-05
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:30～ ミーティングルーム F

昆虫ニコチン性アセチルコリン受容体の再構築とネオニコチノイドの活性

Actions of neonicotinoids on insect nicotinic receptors expressed in *Xenopus* oocytes

○伊原 誠[1]、小森 勇磨[1]、神谷 昌輝[1]、小泉 航[1]、吉成 祐人[2]、丹羽 隆介[2]、SATTELLE David B.[3]、松田 一彦[1] ([1]近畿大農、[2]筑波大、[3]UCL)
○Makoto IHARA[1], Yuma KOMORI[1], Masaki KAMIYA[1], Wataru KOIZUMI[1], Yuto YOSHINARI[2], Ryusuke NIWA[2], David B. SATTELLE[3], Kazuhiko MATSUDA[1] ([1]Kindai Univ., [2]Tsukuba Univ., [3]UCL)

ニコチン性アセチルコリン受容体(nAChR)は、システインループをもつイオノトロピック受容体であり、α サブユニットと non-α サブユニットから成るヘテロ 5 量体構造をもつ。ネオニコチノイドは昆虫の nAChR に対して低濃度ではアンタゴニストとして、高濃度でアゴニストとして働くことで、殺虫効果を発揮すると言われている。しかし、脊椎動物の nAChR とは異なり、昆虫のサブユニットだけからなる nAChR の機能的発現は困難であり、ネオニコチノイドの作用機構を詳細に調べることができなかった。そのため、昆虫の α サブユニットと脊椎動物の non-α サブユニットからなる nAChR がネオニコチノイドの作用機構研究に使用されてきた。

演者らは、小胞体でのフォールディングや輸送に関わる因子が昆虫の nAChR の機能的発現に寄与するのか検証し、膜結合型のチオレドキシン TMX3 が昆虫の nAChR の機能的発現に必須で、RIC-3 と RIC-50 が nAChR の発現量を調節することを見出した。そこで、TMX3、RIC-3 および UNC-50 を補助因子として使用してショウジョウバエの nAChR をアフリカツメガエル卵母細胞で機能的に発現させ、それらに対するネオニコチノイドの活性を評価した。Dβ1 サブユニットの loop D の塩基性アミノ酸（Arg81）をトレオニンに置換するとネオニコチノイドの活性が低下したことから、本アミノ酸との相互作用はネオニコチノイドの活性発現に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

Nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) are ionotropic receptors that mediate fast cholinergic neurotransmissions in the central nervous system in insects. Neonicotinoid insecticides modulate insect nAChRs to kill insects. To date, hybrid nAChRs composed of insect α subunit and vertebrate non-α subunit have been used for investigating the mode of actions of neonicotinoids, because it has been difficult to express functional, robust insect nAChRs in known cell lines and *Xenopus laevis* oocytes. Thus, we have explored missing factors essential for the functional expression of insect nAChRs. We have found that TMX3 plays a crucial role in the functional expression of *Drosophila melanogaster* nAChRs in *Xenopus* oocytes. In the presentation, we show that the Dα1、Dα2、Dβ1 and Dβ2 subunits assembled to form robust nAChRs and that Arg81 in loop D of the Dβ1 subunit is likely involved in the insect nAChR-neonicotinoid interactions.

Ref: Ihara M. *et al PNAS* **117**, 16283-16291 (2020).

nicotinic acetylcholine receptor (nAChR), neonicotinoids, *Xenopus laevis* oocytes

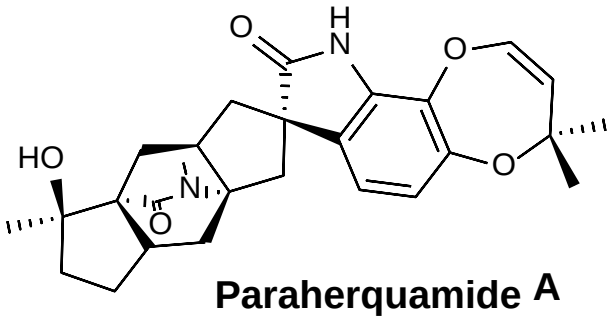
講演番号：3F04-06
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:30～ ミーティングルーム F

スピロコハク酸イミド構造をもつ殺線虫活性物質の標的サブタイプ選択性のメカニズム

Mechanism of the subtype selectivity of a nematicidal compound with a spirosuccinimide moiety

○小泉 航、伊原 誠、松田 一彦（近畿大農）
○Wataru KOIZUMI, Makoto IHARA, Kazuhiko MATSUDA (Kindai Univ.)

インドールアルカロイド・パラヘルクアミド類は、ニコチン性アセチルコリン受容体(nAChR)を標的とする殺線虫剤である。本物質は線虫で発現する B、N および L タイプの nAChR の中で L タイプの nAChR に対して選択的に作用すると言われている。実際、パラヘルクアミド A は線虫 *Carnorhabditis elegans* の N タイプの nAChR より L タイプの nAChR に対して高い阻害活性を示したことから、その原因について検討した。本化合物はホモ 5 量体構造をもつ N タイプの nAChR に対して拮抗的に阻害活性を示した。そこで、本受容体と同様にホモ 5 量体構造をとり、nAChR のアセチルコリン結合部位に類似する構造をもつアセチルコリン結合タンパク質（AChBP）とパラヘルクアミド A が形成する複合体の X 線結晶構造を解明した。本構造中の AChBP とパラヘルクアミド A の相互作用をもとに、*C. elegans* の N タイプと L タイプの nAChR 間で loop C を交換した結果、N タイプの nAChR のパラヘルクアミド A 感受性は上昇した。しかし、L タイプの nAChR では当該置換の効果は限定的であったことから、loop C 以外の部位との相互作用も本物質のサブタイプ選択的 nAChR 阻害活性に寄与すると推察された。



Paraherquamide A

Paraherquamides indole alkaloids are shown to target nematode nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) with selectivity to L-type nAChRs. Indeed, of the *Carnorhabditis elegans* (Ce) nAChRs, paraherquamide A blocked the ACh-induced response of the L-type nAChR more potently than the N-type nAChR. To elucidate the mechanism of such subtype selectivity, the acetylcholine binding protein (AChBP), a surrogate of the orthosteric site of the homomer forming nAChRs, was cocrystallized with paraherquamide A and the X-ray crystal structure was determined. In this structure, loop C formed a hydrogen bond with paraherquamide A and thus the effects of swapping of loop C on the paraherquamide A sensitivity to CeL- and CeN-nAChRs were examined. Replacing the loop C in the N-type nAChR with that of the L-type nAChR resulted in enhanced paraherquamide A sensitivity. However, the inverse mutation had only a small effect on the L-type nAChR, suggesting the other loop is also involved in the high paraherquamide A sensitivity of the L-type nAChR.

fungal compound, ligand-gated ion channel, structure-activity relationship

発表責任者：松田一彦（kmatuda@nara.kindai.ac.jp）

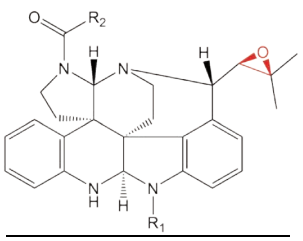
講演番号：3F04-07
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:30～ ミーティングルーム F

コムネシン類の標的活性化作用の構造活性相関

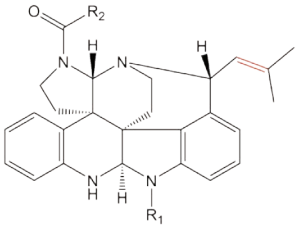
Structure-activity relationship of target site action of communesins

○矢野 雄大[1]、伊原 誠[1]、甲斐 建次[2]、林 英雄[2]、松田 一彦[1] ([1]近畿大農、[2]大阪府大)
○Yudai Yano[1], Makoto Ihara[1], Kenji Kai[2], Hideo Hayashi[2], Kazuhiko Matsuda[1] ([1]Kindai Univ., [2]Osaka Prefec. Univ.)

Communesin 類は糸状菌 *Penicillium expansum* MK-57 株により生産される殺虫活性をもつインドールアルカロイドである。我々はこれまでに Communesin 類が昆虫の抑制性グルタミン酸受容体(GluCl)を活性化することを見出している。



	R_1	R_2
A	CH_3	CH_3
B	CH_3	Pentadienyl



	R_1	R_2
F	CH_3	CH_3
J	CH_3	Pentadienyl

Communesin 類は A から K の異なる構造を持つ 11 種類の類縁体からなり，主にアシル基，エポキシ基，メチル基のこの 3 つの置換基の有無によってグループ分けをすることができる。こうしたグループ分けの指標となる構造が本化合物の GluCl に対する活性においてどの程度寄与しているのか不明である。そこで本研究では、生産菌をオカラ培地で培養し、構造活性相関研究で鍵となる Communesin 類を単離し、GluCl に対する活性を測定した。その結果 Communesin B が最も高い活性を示したことから、活性発現に Pentadienyl 基が寄与していることが示唆された。それに対して、Communesin B とエポキシ基をもたない Communesin J との間では GluCl に対する活性にほとんど差が認められなかったことから、エポキシ基は活性発現に必須でないことが判明した。これらの結果と、殺虫活性との関係をもとに、Communesin 類の構造活性相関について議論する。

Communesins are potent insecticidal indole alkaloids produced by *Penicillium expansum* MK-57. Communesins selectively activate glutamate-gated chloride channels (GluCls) and exhibit neurotoxicity. Communesins have 11 congeners with different structures from A to K and can be grouped by the presence or absence of three functional groups, an acyl group, an epoxy group and a methyl group. In a comparison of communesin A and B in terms of the activity to GluCl, the pentadienyl group was found to play an important role in the activity. On the other hand, no significant difference was observed in the GluCl-activating activity of communesin B and J, suggesting that the epoxy group is not essential for the activity. With these results and the correlation with the insecticidal activity, the structure-activity relationship of Communesins will be discussed.

Fungal product, ligand-gated ion channel, Structure-activity relationship

発表責任者：松田一彦（kmatsuda@nara.kindai.ac.jp）

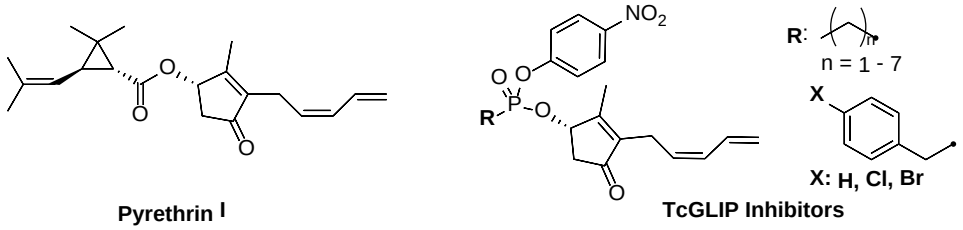
講演番号：3F04-08
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:30～ ミーティングルーム F

ホスホン酸エステル型ピレスリン生合成酵素阻害剤の構造活性相関

Structure-activity relationship of phosphonate inhibitors of a pyrethrin biosynthetic enzyme

○杉坂 如水[1]、小椋 明生[1]、伊原 誠[1]、松尾 憲忠[2]、田辺 陽[2]、松田 一彦[1]([1]近畿大農、[2]関西学院大理工)
○Yukimi SUGISAKA[1], Akio OGURA[1], Makoto IHARA[1], Noritada MATHUO[2], Yoo TANABE[2], Kazuhiko MATHUDA[1] ([1]Kindai Univ., [2]Kwansei Gakuin Univ.)

ピレスリンはシロバナムシヨケギク（除虫菊; Tanacetum cinerariifolium）で生合成される天然殺虫剤である。ピレスリンはエステル化合物で、非メバロン酸経路で生合成される酸部とオキシリピン経路で合成されるアルコール部が TcGLIP と命名した GDSL リパーゼによりエステル化されることにより生成する。これまで我々は、ピレスリン生合成機構の解明を目的として、ホスホネート構造をもつ TcGLIP 阻害剤を数種合成し、それらの TcGLIP 阻害活性を報告してきた。今回我々は本阻害剤の R 部の構造とリン原子の立体配置と TcGLIP 阻害活性との関係について検討した。



Pyrethrin I　　TcGLIP Inhibitors

TcGLIP の阻害剤は、鎖長の異なるアルキル基または *p*-ハロベンジル基をもつホスホン酸 2 塩化物を(*S*)-ピレスロロンとを反応させ、次いで *p*-ニトロフェノールと反応させることによって合成した。合成した化合物の TcGLIP 阻害活性を比較したところ、置換基 R として炭素数 2～8 のアルキル基をもつ化合物では炭素数 4 または 5 程度のものが高い活性を示し、ベンジル基をもつ化合物では無置換のベンジル基より *p*-クロロベンジル基や *p*-ブロモベンジル基をもつ化合物の方が高い活性を示した。リン原子の絶対配置も TcGLIP 阻害活性に対して影響したが、その程度は R の構造により変動した。

The pyrethrum plant *Tanacetum cinerariifolium* biosynthesizes insecticides pyrethrins and accumulated them in flowers and leaves. To understand the mechanism of pyrethrin biosynthesis, phosphonate-type inhibitors were synthesized from substituted phosphonic dichlorides. The compounds were tested on the recombinant TcGLIP, a GDSL lipase underpinning the ester-forming step in pyrethrin biosynthesis. Among the alkyl-substituted phosphonates, compounds with C4 or C5 chains showed the highest TcGLIP inhibitory activity. For the phosphonates having benzyl or substituted benzyl groups, *p*-chlorobenzyl and *p*-bromobenzyl derivatives showed higher activity than unsubstituted benzyl derivative. The absolute configuration of the phosphorus atom also affected the TcGLIP inhibitory activity, effects changing with the substituent structure.

Pyrethrin biosynthesis, Phosphonate, Structure-activity relationship

発表責任者：松田一彦（kmathusda@nara.kindai.ac.jp）

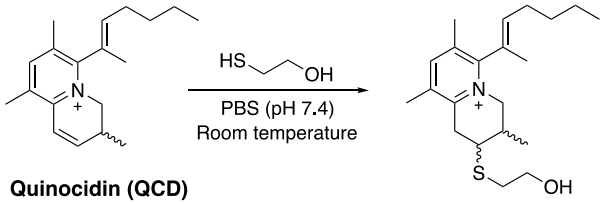
講演番号：3F04-09
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:30～ ミーティングルーム F

不可逆的阻害剤への応用に向けた 3,4-dihydroquinolizinium 化合物の開発

Development of 3,4-dihydroquinolizinium compounds toward the application in the design of covalent inhibitors

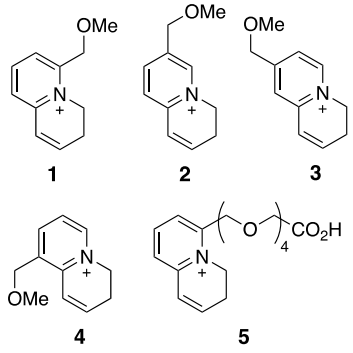
○川合 計太朗[1]、小鹿 一[1]、中川 優[1,2]（[1]名大院・生命農、[2]iGCORE）
○Keitaro KAWAI[1], Makoto OJIKA[1], Yu NAKAGAWA[1,2] ([1]Nagoya Univ., [2]iGCORE)

Quinocidin (QCD) は, 3,4-dihydroquinolizinium (DQ) 環を有するユニークな天然物である[1,2]。我々は，QCD が中性水溶液中，室温でチオールと付加反応を起こすことを見出した。DQ 環に対するチオールの付加反応はこれまでに報告がなく，本ヘテロ環は不可逆的阻害剤の開発における新たな求電子ユニットとして利用できる可能性がある。そこで本研究では，タンパク質阻害剤にアミド結合を介して連結できる DQ 化合物を開発することを目的とした。



Quinocidin (QCD)

まず，求電子ユニットのモデルとして DQ 化合物 **1**～**4** を合成し，チオールに対する反応性を 2-mercaptoethanol との付加実験により評価した。その結果，いずれの化合物も時間依存的に付加体を形成したことから，ピリジニウム部分のいずれの位置にもチオールに対する反応性を消失させることなく置換基が導入可能であることが確認された。本知見をもとに, 末端にカルボキシ基を有する PEG を導入した **5** を合成した。現在，**5** のアミド化反応およびチオールに対する反応性評価を進めているところであり，その結果も併せて報告する。



Naturally-occurring quinocidin (QCD) has a unique 3,4-dihydroquinolizinium (DQ) skeleton that captures thiols in neutral aqueous media. In this study, we synthesized methoxymethyl-substituted DQ compounds (**1**–**4**) and evaluated their thiol-trapping ability as a preliminary study toward the future application of QCD in the design of covalent inhibitors. All DQ compounds were found to bind 2-mercaptoethanol regardless of substitution position. This finding further led us to design and synthesize DQ compound **5** with a carboxyl group-containing PEG chain as a possible electrophilic unit for use in the development of covalent inhibitors. Amide formation and thiol-trapping ability of **5** will be also presented in this meeting.

1) Nakagawa, Y. *et al. Chem. Eur. J.* **2017**, *23*, 17894.　2) Nakagawa, Y. *et al. Bioorg. Med. Chem.* **2020**, *28*, 115308.

heterocycle, michael addition, covalent inhibitor

発表責任者：中川優（yu@agr.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：3F04-10
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:30～ ミーティングルーム F

アミド化したプラディミシン誘導体の凝集性とマンノース結合活性

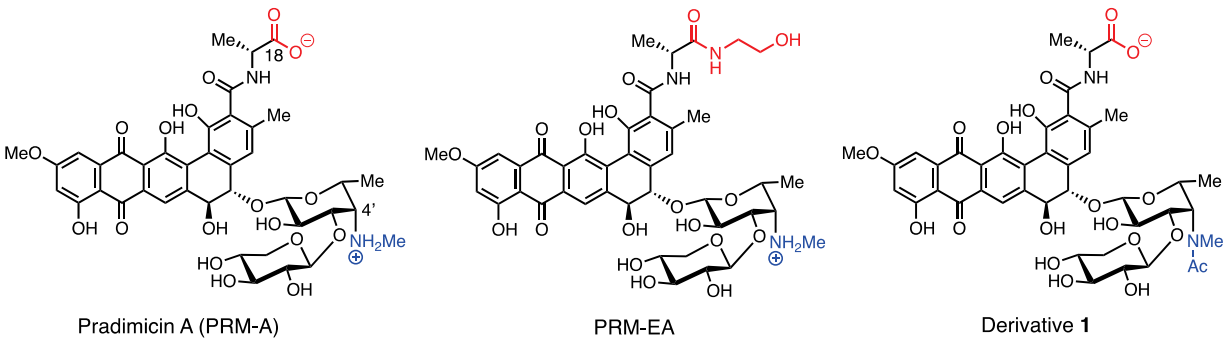
Aggregate-forming and mannose-binding properties of amidated pradimicin derivatives

○大矢 柚香[1]、小鹿 一[1]、五十嵐 康弘[2]、伊藤 幸成[3,4]、中川 優[1,3,5]（[1]名大院・生命農、[2]富山県大・生工、[3]理研、[4]阪大院・理、[5]iGCORE）
○Yuzuka OYA[1], Makoto OJIKA[1], Yasuhiro IGARASHI[2], Yukishige ITO[3,4], Yu NAKAGAWA[1,3,5]
([1]Nagoya Univ., [2]Toyama Prefectural Univ., [3]RIKEN, [4]Osaka Univ., [5]iGCORE)

プラディミシン A (PRM-A) は，マンノース (Man) に特異的に結合する天然色素であり，糖鎖研究への利用が期待されている。しかしながら，PRM-A は凝集性を有するため，研究用ツールとしての利用には制限がある。我々は近年，PRM-A の 18 位カルボキシ基をアミド化した PRM-EA が凝集性をほとんど示さないことを見出した。本知見は，PRM-A の凝集には双性イオンの形成が重要である可能性を示唆するものである。そこで本研究では，4’位アミノ基をアミド化した **1** の凝集性を評価することで本可能性を検証した。

PRM-A のアセチル化とエステル加水分解によって **1** を合成し，その凝集性を沈降試験によって評価した。その結果，**1** は中性水溶液中でほとんど凝集しないことが確認され，PRM-A が双性イオンとなって凝集している可能性が支持された。一方，**1** の Man 結合活性を等温滴定カロリメトリーで評価したところ，PRM-EA は Man 結合能を保持しているのに対し，**1** は Man とほとんど結合しないことが明らかとなった。本結果より，18 位カルボキシ基および 4’位アミノ基のアミド化はいずれも PRM-A の凝集性を抑制できるが，ツール分子開発の観点からは 18 位カルボキシ基のアミド化が有力な化学修飾になることが示唆された。

Two amide derivatives (PRM-EA and **1**) of pradimicin A (PRM-A), a mannose (Man)-binding natural pigment, were compared in terms of aggregate-forming and mannose-binding properties. Precipitation tests demonstrated that both derivatives, unlike PRM-A, hardly aggregated in neutral aqueous solutions. On the other hand, isothermal titration calorimetry experiments found that whereas PRM-EA retained Man-binding ability, **1** was insensitive to Man. There results suggest that amide formation at C18 position is a more practical modification than that at C4’ position from the viewpoint of glycobiological application of PRM-A.



aggregation, carbohydrate binding, Pradimicin

発表責任者：中川優（yu@agr.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：3F04-11
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:30～ ミーティングルーム F

(+)-cannogenol の全合成

Total synthesis of (+)-cannogenol

○渡邉 正悟、西川 俊夫、中崎 敦夫 (名大院生命農)
○ Shogo Watanabe, Toshio Nishikawa, Atsuo Nakazaki (Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University)

強心ステロイドは、Na^+/K^+-ATPase に対する強力な阻害剤であるが、神経変性疾患 [1] などの特定の疾患に対する医薬シーズとしても注目されている。我々は、種々の強心ステロイドを化学合成により容易に供給できれば、創薬や生命科学分野の基礎研究に利用可能であると考え、強心ステロイド類の新規自在合成法の開発に着手した。

我々はこれまでに、自在合成の鍵となる中間体 **1** (Figure 1) のラセミ体の合成法を確立している [2]。本発表では、鍵中間体 **1** の光学活性体の合成とそれを起点として、抗腫瘍活性 [3] を示す強心ステロイド類の共通アグリコンである (+)-cannogenol の全合成を達成したのでその結果を報告する。

Cardiotonic steroids are of particular interest with their unique structural features and specific biological activities (Figure 1).[1,3] Therefore, the establishment of a divergent synthetic strategy for such cardiotonic steroids should prompt to develop more potent drug candidates and/or versatile tool molecules for fundamental researches.

Recently, one possible key intermediate **1** bearing a pendant alkene or a hydroxy group on each steroidal ring: an essential platform for installation of oxy-functionalities, has already been synthesized in our lab.[2] In this presentation, details on the total synthesis of (+)-cannogenol from the key intermediate **1** will be disclosed.

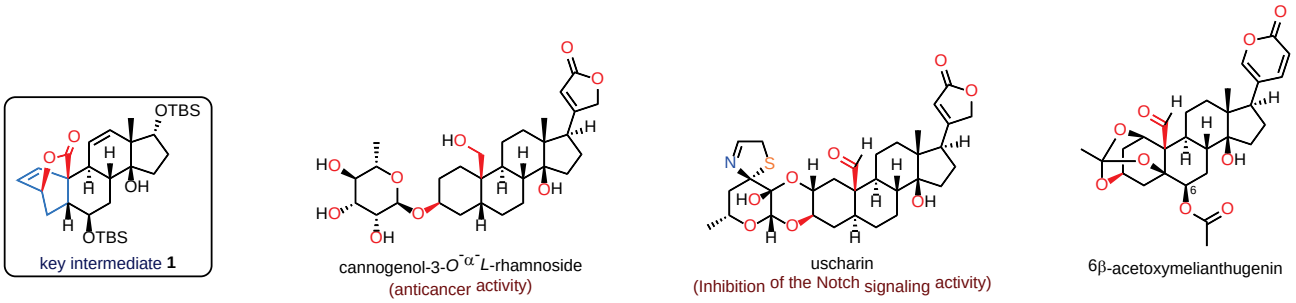


Figure 1. Structures of our synthetic key intermediate **1** and cardiotonic steroids.

[1] Arai, A. M.; Ishibashi, M. *et al. J. Nat. Prod.* **2017**, *80*, 2453.

[2] a) Watanabe, S., Nishikawa, T., Nakazaki, A. *Org. Lett.* **2019**, *21*, 7410.

b) 渡邉正悟、西川俊夫、中崎敦夫 日本農芸化学会 2020 年度大会, 3B11p12.

[3] Nagorny, P. *et al. J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 4849.

total synthesis, (+)-cannogenol, cardiotonic steroid

発表責任者：中崎敦夫（nakazaki@agr.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：3F04-12
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:30～ ミーティングルーム F

19-nordigitoxigenin の全合成

Total synthesis of 19-nordigitoxigenin

○松村 泰志、西川 俊夫、中崎 敦夫 (名大院生命農)
○ Taishi MATSUMURA, Toshio NISHIKAWA, Atsuo NAKAZAKI (Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University)

強心ステロイドは、昆虫、両生類や植物などの様々な生物から単離される、高度に酸化されたステロイドである。19 位メチル基の欠損した強心ステロイド（19-ノルステロイド）である antiaroside Y は、東南アジア広域に生息する植物 *Antiaris toxicaria* から単離された、ヒト肺癌細胞の増殖阻害活性を示す化合物である(Figure 1)。本研究では、antiaroside Y のアグリコンである 19-nordigitoxigenin (**1**)のラセミ合成を達成したので報告する。

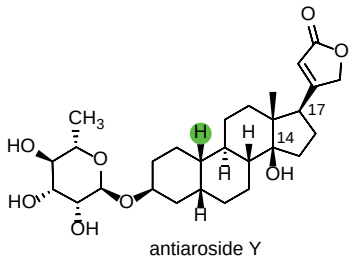
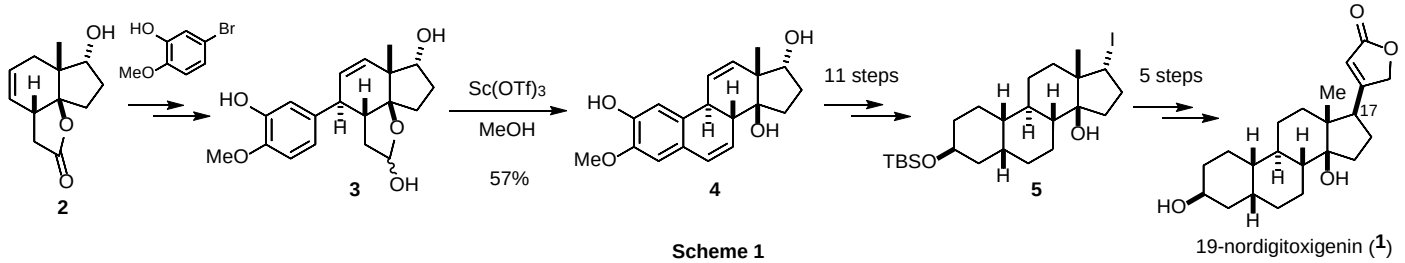


Figure 1

当研究室で開発された CD 環セグメント **2**[1] に対して、ブロモアレーンとの溝呂木-Heck 反応を経て、ラクトール **3** へと変換した(Scheme 1)。その後、$Sc(OTf)_3$ を用いた、Friedel-Crafts 型の脱水環化反応により、四環性化合物 **4** を得た。そして、酸化度を調整し、ヨウ化アルカン **5** へと変換した後、我々が独自に開発した方法を用いてブテノリドの構築を行うことで、**1** の全合成を達成した。

Antiaroside Y, isolated from plant *Antiaris toxicaria*, exhibited a potent antiproliferative activity against human cancer cell lines (Figure 1). This compond is anticipated to be a seed compound for anticancer therapies. In this presentation, we report total synthesis of its aglycone, 19-nordigitoxigenin (**1**) (Scheme 1).

CD-Ring segment **2**[1] was converted into lactol **3** through Mizoroki-Heck reaction. Friedel-Crafts-type cyclodehydration using $Sc(OTf)_3$ afforded tetracycle **4** in 57% yield. Alkyl iodide **5** derived from **4**, was converted into **1** via a newly developed method to introduce C17-butenolide.



Scheme 1

Reference: [1] Nakazaki, A.; Hashimoto, K.; Ikeda, A.; Shibata, T.; Nishikawa, T. *J. Org. Chem*. **2017**. *82*, 9097.

total synthesis, cardiotonic steroid, butenolide

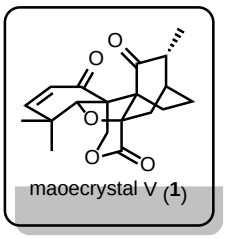
発表責任者：松村泰志（matsumura.taishi@b.mbox.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：3F04-13
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:30～ ミーティングルーム F

マオエクリスタルVの合成研究

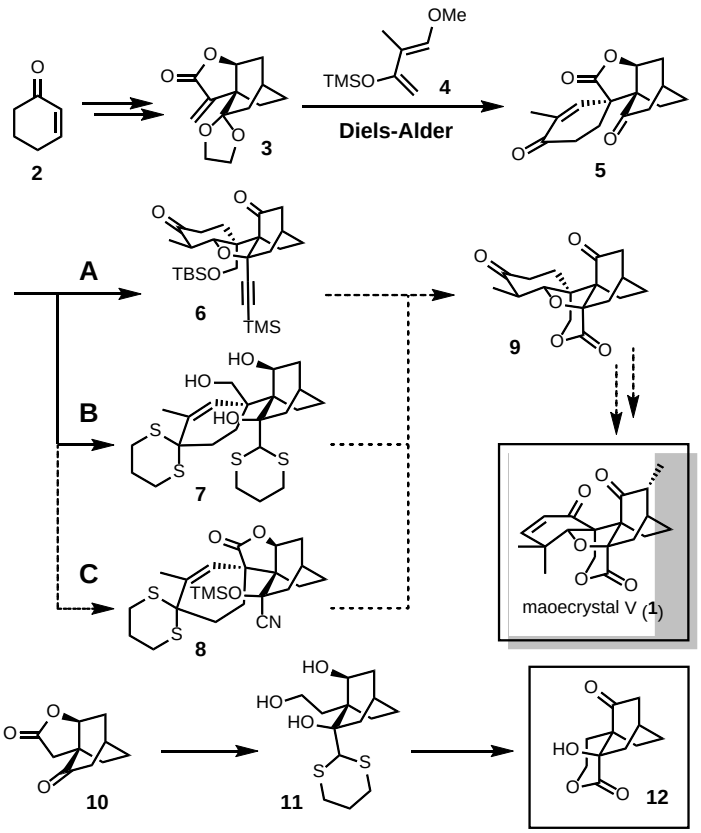
Synthetic studies of maoecrystal V

○片山 峻樹、浦 達哉、井田 浩介、佐藤 勇気、泉 実、清田 洋正（岡大院・環境生命）
○Shunki KATAYAMA, Tatsuya Ura, Kousuke Ida, Yuki Sato, Minoru Izumi, Hiromasa Kiyota (Okayama Univ.)



【目的】中国産ハーブ *Isodon eriocalyx* から単離された，複雑な五環性化合物 maoecrystal V (**1**) は，HeLa 細胞に対して選択的に強い増殖阻害活性を示すことから，抗がん剤リードとして期待されている[1]。我々は，**1** の全合成を目的としている。

【方法・結果】Cyclohexenon **2** を出発原料とし,ジエノフィル **3** を合成した。**3** とジエン **4** から Diels-Alder 反応によりケトラクトン **5** を高収率かつ高選択的に得ることに成功した。この後，３つのルートを計画し合成を進めた。



（ルート A）**5** から数工程で四環式化合物 **6** を得た。**6** から６員環化を行い **1** の合成を目指す。

（ルート B）**5** から数工程でトリオール **7** に導いた。**7** から６員環ラクトンを構築した後，エーテル環化を行う予定である。このルートに先立つモデル合成では, **10** からトリオール **11** を経てラクトン環モデル **12** の合成に成功した。

（ルート C）**5** からシアノ基を導入して **7** とした後，６員環ラクトン化とエーテル環化を行う計画である。

【Introduction】 Maoecrystal V (**1**), isolated from leaves of a Chinese medicinal herb *Isodon eriocalyx*, has an unique rearranged *ent*-kaurane skeleton and showed remarkable inhibitory activity against Hela cells.[1] Our purpose is total synthesis of **1**.

【Methods and results】 Dienophile **3** was synthesized from cyclohexenon **2**. Diels-Alder reaction of **3** with diene **4** gave ketolactone **5** in high yield and high selectivity. Three synthetic routes have been examined. (Route A) Alkyne moiety was introduced to **5** and the THF ring was constructed by bromoetherification to afford **6**. (Route B) 1,3-Dithiane was used as C1 fragment (**7**). 6-Membered model lactone **12** was synthesiszed from **10** by oxidative deprotection-hemiacetal formation *via* **11**. (Route C) Synthetic studies *via* cyanohydrin **8** using model compounds are in progress.

[1] S. H. Li *et al*., *Org*. *Lett*. **2004**, *6*, 4327.

maoecrystal V, total synthesis, 1,3-dithiane

講演番号：3F04-14
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:30～ ミーティングルーム F

パルミトイル化されたヒストン H4 の化学合成および機能解析
Chemical Synthesis of Histone H4 and Functional Analysis

○中谷 文香[1]、末武 勲[2]、北條 裕信[1] ([1]大阪大学、[2]中村学園大学)
○Fumika NAKATANI[1], Isao SUETAKE[2], Hironobu HOJO[1] ([1]Osaka Univ., [2]Nakamura Univ.)

DNA はヒストンオクタマーの周りに巻きついてヌクレオソームとなり、核内にコンパクトに収められている。ヒストンオクタマーは H2A と H2B、H3、H4 のコアヒストン 2 分子ずつから構成されている。それぞれのコアヒストンは蛋白質に翻訳された後、N 末端領域にメチル化やアセチル化などの様々な翻訳後修飾を受ける。ヒストンの翻訳後修飾は染色体の構造や遺伝子発現の制御などに深く関与している。

以前、H4 の Ser^{47} に O-パルミトイル修飾を受けることが報告された (Zou et al., J. Biol. Chem. 2011) 。パルミトイル修飾を受けると、遺伝子発現や細胞周期の進行、有糸分裂に影響すると考えられるが、未だその機能は解明されていない。そこで、O-パルミトイル化された H4 の化学合成および機能解析を本研究の目的とした。

合成戦略として、102 残基のアミノ酸から構成される H4 を、H4(1－28) と H4(29－56) 、H4(57－102) に分割し、それぞれを Fmoc 固相法によって合成した。その後、H4(1－28) は C 末端をアリールチオエステル、H4(29－56) は C 末端をアルキルチオエステルに変換し、最後にチオエステル法 (Hojo et al., Bull. Chem. Soc. Jpn. 1991) による One-pot ligation 法 (Asahina et al., Angew. Chem. Int. Ed. 2013) を用いて目的の H4 を得ることが出来た。

今後、パルミトイル化された H4 の構造や機能の解明を行う予定である。

Core histone is composed of four types, H2A, H2B, H3, and H4. Two molecules of each are assembled to form an octamer which winds up DNA. After being translated into protein, histone undergoes post-translational modifications (PTMs) such as acetylation and methylation, which play roles in chromatin function, regulating gene expression and so on.

Previously, it was reported that the Ser^{47} of histone H4 is modified with O-palmitoylation (Zou et al., J.Biol.Chem. 2011). Palmitoyl modification is thought to be involved in gene expression, cell cycle progression, and mitosis. However, function of the modification is unknown. In this study, the chemical synthesis and functional analysis of O-palmitoylated H4 were performed to clarify the role of the modification.

H4 was divided into three segments, H4(1－28), H4(29－56), and H4(57－102). Each segment was synthesized by the solid phase method by the Fmoc method. H4(1－28) and H4(29－56) were then converted to the C-terminal aryl and alkyl thioester, respectively. Finally, three segments were condensed using one-pot ligation (Asahina et al., Angew. Chem. Int. Ed. 2013) by the thioester method (Hojo et al., Bull. Chem. Soc. Jpn. 1991) to successfully obtain the designed Ser^{47}-palmitoylated H4.

palmitoyl, peptide synthesis, ligations

講演番号：3F04-15
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:30～ ミーティングルーム F

2,6-2 置換ピペリジン環の立体選択的な構築法の開発と(+)-solenopsin の合成

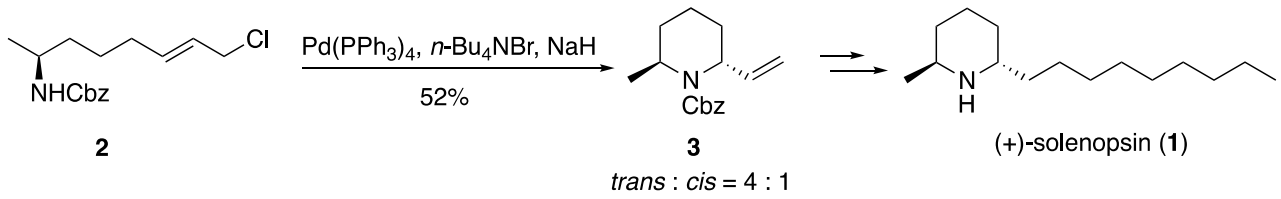
Development of construction of 2,6-disubstituted piperidine ring and synthesis of (+)-solenopsin

○真壁 秀文[1]、鈴木 香名[2]、河村 篤[1]、服部 恭尚[3]([1]信州大バイオメディカル研、[2]信州大院総合理工、[3]京都薬大機器分析セ)
○ Hidefumi Makabe[1], Kana Suzuki[2], Atsushi Kawamura[1], Yasunao Hattori[3] ([1]Institute for Biomedical Sciences, Shinshu Univ., [2]Graduate School of Science and Technology, Shinshu Univ., [3]Center for Instrumental Analysis, Kyoto Pharmaceutical Univ.)

2,6-ピペリジンアルカロイドは，構造多様性に富む天然有機化合物群の一つである。顕著な生物活性を有する化合物が多く知られており，合成研究が活発に行われている。2 位と 6 位のアルキル鎖の立体化学は *cis* または *trans* 体であり，化学合成では立体選択的なピペリジン環の構築が課題となる。

我々は上記の課題を解決するために，2 価のパラジウム触媒を用いた立体選択的な環化反応を開発してきた。その結果，*cis*-2,6 体はほぼシングルジアステレオマーで生成物を得ることができ，天然物である(−)-isosolenopsin などの合成に応用した。一方，*trans* 体に関してはパラジウム触媒に関して種々のリガンドを用いて反応性と立体選択性を検討したが，良い選択性を得ることはできなかった。そこで只野らの条件を参考にして，アリル位にハロゲンを導入した環化前駆体 **2** に対して 0 価のパラジウムを用いたところ，4:1 の比で *trans* 選択的にピペリジン環 **3** を合成することができた。環化生成物 **3** を用いて，ヒアリの毒素の一種である(+)-solenopsin (**1**)の合成を行った。

本講演では上記の研究の詳細について説明する。



2 **3** (+)-solenopsin (**1**)

trans : *cis* = 4 : 1

Piperidine alkaloids exist abundantly in nature and possess significant biological activities. Among naturally occurring piperidines, *cis*- and *trans*-2,6-disubstituted piperidine alkaloids are very important components for drugs. Until now, a large number of synthetic studies on 2,6-disubstituted piperidine alkaloids have been reported. To construct 2,6-disubstituted piperidine ring in a stereoselective manner, we have reported Pd(II)-catalyzed cyclization of amino allylic alcohol. This reaction is very useful to prepare *cis*-2,6-piperidine ring. We reported the synthesis of (−)-isosolenopsin using this reaction. However, preparation of *tans*-2,6-piperidine ring is rather difficult using this reaction. Thus, we switched to use Pd(0)-catalyzed cyclization of allylic halide **2** as a substrate. The result of stereoselectivity of *trans* to *cis* was 4:1. Herein, we report the detailed study of Pd-catalyzed *N*-alkylation and cyclization to obtain *trans*-2,6-piperidine preferentially and its application to a synthesis of (+)-solenopsin (**1**).

The detailed studies on Pd-catalyzed stereoselective formation of piperidine rings and its application to the synthesis of (+)-solenopsin (**1**) will be presented in this symposium.

piperidine alkaloid, palladium-catalyzed cyclization, natural product

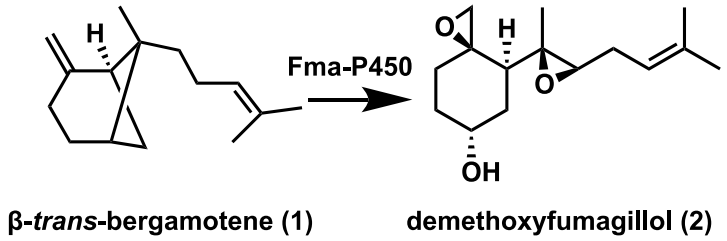
発表責任者：真壁秀文（makabeh@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：3F04-16
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:30～ ミーティングルーム F

ヒト培養細胞を宿主とした抗生物質の生産
Production of antibiotics in mammalian cells

○松田 真弥[1]、恒松 雄太[1]、尾形 勇二[1]、蜂矢 志保実[1]、岸本 真治[1]、三好 規之[2]、渡辺 賢二[1] ([1]静岡県大薬、[2]静岡県大院食品栄養環境科学)
○ Shinya Matsuda[1], Yuta Tsunematsu[1], Yuji Ogata[1], Shihomi Hachiya[1], Shinji Kishimoto[1], Noriyuki Miyoshi[2], Kenji Watanabe[1] ([1]Dept. Pharm. Sci., University of Shizuoka, [2]Grad. Sch. Nutr. Env. Sci., University of Shizuok)

天然物は強力な生物活性を示すが、標的以外の細胞にも作用してしまうケースが多い。そこで我々は、標的細胞でのみ天然物の効果を発揮させる新たな仕組みを考案した。すなわち、天然物生合成遺伝子を疾患細胞に遺伝子導入し、疾患細胞内で天然物を産生できれば、副作用なく直接疾患を治療することが可能となる。しかしながら、哺乳動物細胞において天然物生合成遺伝子を異種発現させた前例はない。そこで本研究では、哺乳動物細胞内で天然物の生合成が可能であるか検証した。細胞内で産生させる天然物として、*Aspergillus fumigatus* が産生するフマギロール前駆体に着目した。フマギロール前駆体は、シトクロム P450 である Fma-P450 が β-*trans*-bergamotene **(1)**を酸化することで生成される (Watanabe, K. et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 2014)。そこで、ウイルスベクター用いて Fma-P450 を HeLa 細胞に遺伝子導入し、**1** を培養液に添加して LC-MS 分析を行った。その結果、培養液中にて demethoxyfumagillol **(2)**が検出された。すなわち、HeLa 細胞内で発現させた Fma-P450 によって **1** が **2** へと変換され、培養液中に分泌されたと推測される。この結果より、天然物生合成遺伝子を導入することで、哺乳動物細胞において天然物は生産可能であることが明らかとなった。



β-*trans*-bergamotene (1)　　demethoxyfumagillol (2)

Biosynthetic genes are not only responsible for the formation of bioactive substances, but also provide a various of potent applications such as gene therapy. However, the heterologous expression system of biosynthetic genes remains to be established in mammalian cells. In this study, we examined that mammalian cells can produce antibiotics. We initially focused on Fma-P450, which plays central role in the fumagillol biosynthetic pathway in *Aspergillus fumigatus*. Because Fma-P450 catalyzes multiple reactions for the formation of fumagillol precursors through an oxidation of **1**, we tested the production of **2** by expression of Fma-P450 in HeLa cells using virus vectors. To confirm the production of fumagillol precursors in HeLa cells, we performed LC-MS analysis. Biosynthesis of **2** was observed in the culture medium supplemented with **1** in HeLa cells expressing Fma-P450. The result indicates that mammalian cells have a capability of producing antibiotics by expressing biosynthetic genes coded in the genome of microorganism.

antibiotics, mammalian cells, gene therapy

発表責任者：渡辺賢二（kenji55@u-shizuoka-ken.ac.jp）

講演番号：3F07-01
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:30～ ミーティングルーム F

黒ダイズ種皮アントシアニンの新しい生合成経路

New biosynthetic pathway of cyanidin 3-glucoside found in seed coat of black soybean

○吉田 久美[1]、テッパブット ヤダー[1]、澤口 怜央[1]、尾山 公一[2]、西崎 雄三[3]、合田 幸広[3]、近藤 忠雄[1] ([1]名大院情報、[2]名大物国セ、[3]国立衛研)
○Kumi YOSHIDA[1], Yada TEPPABUT[1], Reo SAWAGUCHI[1], Kin-ichi OYAMA[2], Yuzo NISHIZAKI[3], Yukihiro GODA[3], Tadao KONDO[1] ([1]Grad. Sch. Informatics, Nagoya Univ., [2]RCMS, Nagoya Univ., [3]NIHS)

【目的】黒ダイズ（*Glycine max*）の種皮色素は、自然界に最も普遍的に存在するアントシアニンのシアニジン 3-グルコシド(Cy3G)で乾燥種皮あたり 15 mg/g と極めて高濃度に集積する。通常、莢の中では、緑色のいわゆる枝豆の状態から登熟までに約２ヶ月かかるが、莢から出して光を照射すると１日で登熟が進み種皮が黒色になることがわかった。この機構の解明を目的に研究を行った。
【方法および結果】未熟な種皮に 5,7,3′,4′-テトラヒドロキシフラブ-2-エン-3-オール 3-グルコシド（2F3G）が含まれることが既に報告されていた[1]。2F3G は極めて不安定な化合物であったが、Cy3G の還元により調製し、黒化に伴う 2F3G と Cy3G の定量分析を実施した。2F3G が減少して Cy3G がそれに応じた量増加することがわかった。これは、莢中での登熟ならびに、莢からだして急速に黒化した際の両方で観測された。この反応は、暗所では進まないこと、ならびに明所では、黒化に伴い種子の乾燥が進むこともわかった。黒ダイズ種皮における Cy3G の生合成においては、先に３位配糖化が起こり、その後酸化されてアントシアニンとなる新規経路によることが明らかになった[2]。さらにこの反応には光が必要とわかった。

In the seed coat of mature black soybean, *Glycine max*, a high amount of cyanidin 3-*O*-glucoside (Cy3G, >15 mg/g dry seed coat), which is the most abundant anthocyanin in nature, accumulates. It takes approximately two months for the seed coat color change from green to black in pod, however, immature green beans rapidly change to black within one day when the shell is removed. We analyzed the components involved in the color change of the seed coat and detected a new precursor of Cy3G, namely 5,7,3′,4′-tetrahydroxyflav-2-en-3-ol 3-*O*-glucoside (2F3G). Through quantitative analysis using purified Cy3G and synthesized 2F3G, it was clarified that during this rapid color change, an increase in the Cy3G content was observed along with the corresponding decrease in the 2F3G content. It was also found that this reaction does not proceed in the dark, and that in the light, the drying of the seeds increases with blackening. This finding proposes a new biosynthetic pathway of Cy3G that glycosylation was taken at the first, then, oxidized to give Cy3G.

[1] Fukami, H., et al., *J. Oleo Sci.* **62**, 623–629 (2013)
[2] Yoshida, K. et al., *Sci. Rep.*, **10**, 17184 (2020).

anthocyanin biosynthesis, black soybean, flavenol derivative

発表責任者：吉田久美（yoshidak@i.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：3F07-02
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:30～ ミーティングルーム F

オオケビラゴケ由来ビベンジルカンナビノイドの生合成研究

Biosynthetic study of bibenzyl cannabinoids from *Radula perrottetii*

○田浦 太志[1]、高橋 宏暢[2]、兼目 裕充[2]、浅川 義範[2]、保野 陽子[3]、品田 哲郎[3] ([1]富山大薬、[2]徳島文理大薬、[3]大阪市立大理)
○Futoshi TAURA[1], Hironobu TAKAHASHI[2], Hiromichi KENMOKU[2], Yoshinori ASAKAWA[2], Yoko YASUNO[3], Tetsuro SHINADA[3] ([1]Toyama Univ., [2]Tokushima Bunri Univ., [3]Osaka City Univ.)

苔類オオケビラゴケ（*Radula perrottetii*）は大麻の活性成分に構造が類似したビベンジルカンナビノイドの perrottetinene を含有する。本研究では perrottetinene の生合成メカニズム解明を目的とした。

カンナビノイドは FAD オキシダーゼが触媒する基質ゲラニル基の酸化閉環反応により生合成される。そこでオオケビラゴケのトランスクリプトームをスクリーニングすることで 3 種の FAD オキシダーゼ（RpOx1-3）を同定し、組換え酵素を発現して酵素活性を測定した。この結果、perrottetinene 前駆体と推定したゲラニル化ビベンジルを基質とするアッセイではいかなる生成物も確認できなかった。カンナビノイドはカルボン酸を有する分子として生成することが知られており、またオオケビラゴケの同属植物は perrottetinenic acid を生産することが報告されている。そこで次にカルボン酸を有する基質を用いてアッセイを行なった結果、RpOx3 の反応液に酸化生成物が確認された。本生成物を単離して構造解析したところ、クロメン環を有する新規化合物であることを確認し、これを radulachromenic acid と命名した。以上のように RpOx3 は perrottetinene および perrottetinenic acid ではなく、新規なビベンジルカンナビノイドを合成するという興味深い結果を得た。本酵素は幅広い基質特異性を示すことも確認しており、あわせて報告する。

Radula perrottetii produces perrottetinene, a bibenzyl cannabinoid structurally similar to cannabinoids in *Cannabis sativa*. The aim of this study is to elucidate the biosynthetic mechanism of perrottetinene.

Cannabinoids are biosynthesized by FAD oxidases via oxidocyclization of the geranyl moiety of substrate. We thus explored the transcriptome of *R. perrottetii*, and identified the genes encoding FAD oxidases named RdOx1-3. The recombinant RpOx1-3, which were prepared in yeast, did not catalyze any reactions with the presumed substrate 4-geranyl dihydropinosylvin. We suspected it is not a suitable substrate, because cannabinoids are generally biosynthesized in their acidic forms, in addition, a liverwort belonging to the genus Radula reportedly produces perrottetinenic acid. We next performed enzyme assays using an acidic substrate, and consequently detected an oxidized product when RpOx3 was used as the enzyme. The reaction product was isolated and characterized to be a novel chromene-containing bibenzyl cannabinoid named radulachromenic acid. As described, RdOx3 herein identified synthesized neither perrottetinene nor perrottetinenic acid, but it is an interesting enzyme producing a novel bibenzyl cannabinoid radulachromenic acid. The promiscuous substrate specificity of RpOx3 will also be presented in the session.

Bibenzyl cannabinoid, Radula perrottetii, Biosynthesis

発表責任者：田浦太志（taura@pha.u-toyama.ac.jp）

講演番号：3F07-03
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:30～ ミーティングルーム F

シロイヌナズナにおけるフェアリー化合物の生合成に関連した新規プリン代謝の解明

Elucidation of novel purine metabolism related to biosynthesis of fairy chemicals in *Arabidopsis thaliana*

○竹村 太秀[1,2]、谷口 有希[3]、崔 宰熏[1,3,4]、平井 浩文[1,3,4]、菅 敏幸[5]、本橋 令子[1,3,4]、河岸 洋和[1,3,4]
([1]静岡大院創造、[2]JSPS、[3]静岡大院総合農、[4]静岡大グリーン研、[5]静岡県大薬)
○ Hirohide TAKEMURA[1,2], Yuki TANIGUCHI[3], Jae-Hoon CHOI[1,3,4], Hirofumi HIRAI[1,3,4], Toshiyuki KAN[5], Reiko MOTOHASHI[1,3,4], Hirokazu KAWAGISHI[1,3,4] ([1]Grad. Sch. of Sci. and Technol., Shizuoka Univ., [2]JSPS, [3]Grad. Sch. of Integ. Sci. and Technol., Shizuoka Univ., [4]RIGST, Shizuoka Univ, [5]Sch. of Pharm. Sci., Univ. of Shizuoka)

フェアリーリングとは、芝草がリング状に繁茂あるいは枯死した後にキノコが発生する現象である。当研究室ではこの原因物質として 2-azahypoxanthine (AHX)、imidazole-4-carboxamide (ICA)、及び 2-aza-8-oxohypoxanthine (AOH) を発見し、フェアリー化合物 (Fairy Chemicals: FCs) と称している。また、FCs は植物に対して成長調節活性やストレス耐性の向上、普遍的内生が確認されたことから、新たな植物ホルモン候補として研究を行っている。[1]

当研究室はこれまで、イネとフェアリーリング形成菌であるコムラサキシメジを研究対象に、図 1 に示すような FCs の生合成経路を明らかにした。本経路はプリン代謝の上流から分岐する新規プリン代謝であった。プリン代謝は生物の生命活動に重要な経路であり、そのため、この新規プリン代謝も同様に生命活動に寄与している可能性がある。本研究では、新規プリン代謝の植物における普遍性並びに既知プリン代謝との関連について、イネと異なる科に属するシロイヌナズナを用いて検討した。

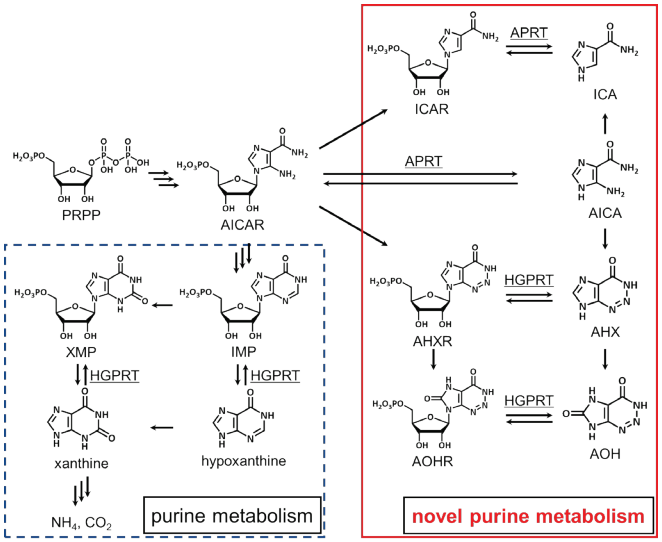


Fig. 1 FCs biosynthetic pathway

"Fairy rings" is a phenomenon in which mushrooms occur after plant growth or death in the form of a ring. Three compounds, 2-azahypoxanthine (AHX), imidazole-4-carboxamide (ICA), and 2-aza-8-oxohypoxanthine (AOH) were identified as the fairy ring inducing compounds and named as fairy chemicals (FCs). FCs regulated the plant growth and conferred stress tolerance to plants. Furthermore, FCs have been proven to be present endogenously in all the plants tested. These results suggested the possibility that FCs are a novel plant hormone.

The pathway shown in Fig. 1 was clarified as the biosynthetic pathway of FCs in rice. This is a novel purine metabolism which diverges from the upstream of purine metabolism. Purine metabolism is important for all living organisms, suggesting that this pathway also contributes to vital activities. In this study, we examined the universality of novel purine metabolism and its relationship with purine metabolism in *Arabidopsis thaliana*.

1. Kawagishi, H. Are fairy chemicals a new family of plant hormones? *Proc. Japan Acad. Ser. B* **95**, 29–38 (2019).

biosynthesis, plant hormones, purine metabolism

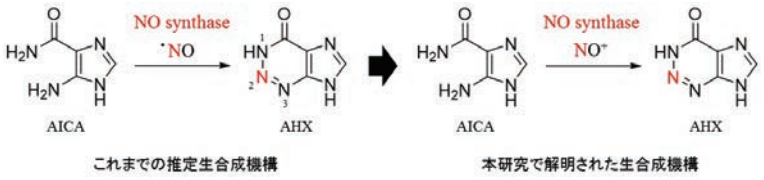
発表責任者：河岸洋和（kawagishi.hirokazu@shizuoka.ac.jp）

講演番号：3F07-04
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:30～ ミーティングルーム F

コムラサキシメジにおける 2-azahypoxanthine に特異なトリアジン基の形成機構に関する研究
Studies on the formation machinery of a unique triazine moiety specific to 2-azahypoxanthine in *Lepista sordida*

○鈴木 兵梧[1]、伊藤 彰将[2,3]、古田島 美颯[2]、崔 宰熏[1,2,4]、鈴木 智大[5]、平井 浩文[1,2,4]、浅川 倫宏[6]、大内 仁志[7]、稲井 誠[7]、菅 敏幸[7]、道羅 英夫[4]、河岸 洋和[1,2,4] ([1]静大農・応生化、[2]静大院・創造、[3]JSPS、[4]静大・グリーン研、[5]宇都宮大・バイオ、[6]東海大・海洋、[7]静県大・薬)
○Hyogo SUZUKI[1], Akinobu ITO[2,3], Mihaya KOTAJIMA[2], Jae-Hoon CHOI[1,2,4], Tomohiro SUZUKI[5], Hirohumi HIRAI[1,2,4], Tomohiro ASAKAWA[6], Hitoshi OUCHI[7], Makoto INAI[7], Toshiyuki KAN[7], Hideo DOHRA[4], Hirokazu KAWAGISHI[1,2,4] ([1]Dept. Appl. Life Sci., Shizuoka Univ., [2]Grad. Sch. Sci. Tech., Shizuoka Univ., [3]Res. Fellow Jpn. Soc. Promo. Sci., [4]Res. Inst. Green Sci. Tech., Shizuoka Univ., [5]Ctr. Biosci. Res. Educ., Utsunomiya Univ., [6]Dept. Fish-Food Sci., Tokai Univ., [7]Dept. Pharm. Sci., Univ. of Shizuoka)

現在までに、約 200 種類の様々な生物活性を示す窒素-窒素（N-N）結合含有天然物が単離、同定されている[1)]。コムラサキシメジ菌糸体培養濾液から単離された 2-azahypoxanthine（AHX）もその 1 種である。AHX はフェアリーリングにおいてシバを成長させる物質として発見され、分類学上の科に無関係に試験した全ての植物に対して成長調節活性を示し、AHX の農業における実用化が期待されている[2,3)]。AHX は天然物として前例が無い六員環に窒素原子が 3 個連続した 1,2,3-トリアジン基を有しており、本研究では、その唯一無二な骨格の形成機構の完全解明を目的とした。



N-N 結合形成には、NO synthase（NOS）によって L-Arg から産生される NO の関与が多く提唱されており、コムラサキシメジにおける AHX の生合成においても同様な結果が得られている[1,4)]。コムラサキシメジのゲノムから計 8 個の NOS 遺伝子（LsNOS1–8 遺伝子と命名）を発見し、更に、分子系統解析の結果、LsNOSs は既存の NOSs とは系統的に異なるグループを形成する新規性の高い構造を有していることが判明した。即ち、LsNOSs が極めて特徴的な進化を辿ってきたことが示唆された。次に、最大の発現量を示した LsNOS2 遺伝子を大腸菌において発現させ、その組換え酵素（rLsNOS2）によるトリアジン基形成反応を検討した。その結果、rLsNOS2 は NO_2^-の供給に関与し、更に、低 pH 条件によって NO_2^-から生成したニトロソニウムイオン（NO^+）が真の活性種として 5-aminoimidazole-4-carboxamide（AICA）と非酵素的に反応することで、AHX に特異なトリアジン基が形成されることが *in vitro* において初めて証明された。

A plant growth-regulator, 2-azahypoxanthine (AHX), was isolated from the culture broth of a fairy ring-forming fungus, *Lepista sordida*[2,3)]. AHX has a unique triazine moiety in the structure, however, the formation process of the moiety has been unknown. We here revealed the nitrogen source and the mechanism in the conversion from 5-aminoimidazole-4-carboxamide (AICA) to AHX for the first time. *In vitro* enzyme assay using recombinant LsNOS2 (rLsNOS2) proved that nitrite produced by rLsNOS2 was converted into nitrosonium ion (NO^+) under an acidic condition, and AICA accepted NO^+ as the nitrogen source, resulting in the unique triazine ring in AHX.

【参考文献】1) Blair, L.M. & Sperry, J. *J. Nat. Prod.* **76**, 794–812 (2013). 2) Kawagishi, H. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **82**, 752–758 (2018). 3) Kawagishi, H. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B* **95**, 29–38 (2019). 4) 伊藤 彰将, 河岸 洋和ら. 日本農芸化学会大会講演要旨集, p914 (2020).

biosynthetic machinery, *Lepista sordida*, nitric oxide synthase
発表責任者：河岸洋和（kawagishi.hirokazu@shizuoka.ac.jp）

講演番号：3F07-05
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:30～ ミーティングルーム F

ICA の代謝産物である S-ICAr-H の存在意義についての研究

Study on the significance of existence of ICA metabolite, S-ICAr-H

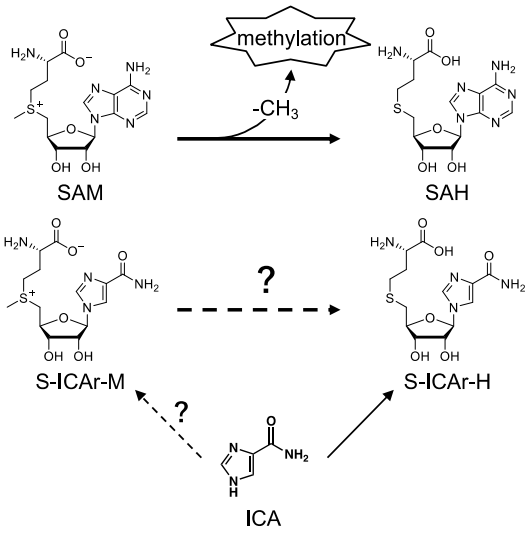
○古田島 美颯[1]、崔 宰熏[1,2,4]、呉 静[2]、謝 肖男[3]、木村 洋子[4]、道羅 英夫[2]、大西 利幸[1,2,4]、平井 浩文[1,2,4]、浅川 倫宏[5]、大内 仁志[6]、稲井 誠[6]、菅 敏幸[6]、河岸 洋和[1,2,4] ([1]静大院・創造、[2]静大・グリーン研、[3]宇都宮大・バイオ、[4]静大院・総合農、[5]東海大・海洋、[6]静県大・薬)

○Mihaya KOTAJIMA[1], Jae-Hoon CHOI[1,2,4], Jing WU[2], Xiaonan XIE[3], Yoko KIMURA[4], Hideo DOHRA[2], Toshiyuki OHNISHI[1,2,4], Hirofumi HIRAI[1,2,4], Tomohiro ASAKAWA[5], Hitoshi OUCHI[6], Makoto INAI[6], Toshiyuki KAN[6], Hirokazu KAWAGISHI[1,2,4] ([1]Grad. Sch. of Sci. and Technol., Shizuoka Univ., [2]RIGST, Shizuoka Univ., [3]Center for Biosci. Res. and Educ., Utsunomiya Univ., [4]Grad. Sch. of Inte. Sci. and Tech., Shizuoka Univ., [5]Marine Sci. and Technol., Tokai Univ., [6]Sch. of Pharm. Sci., Univ. of Shizuoka)

S-adenosyl-L-methionine（SAM）はメチル基供与体として、生体内の大部分のメチル化反応を担っており、SAMはメチル基を供与した後に*S*-adenosyl-L-homocysteine（SAH）となる。

芝草の病気の一種であるフェアリーリングの惹起物質 imidazole-4-carboxamide（ICA）は、植物成長抑制活性を有している[1]。我々は、イネにおけるICAの代謝産物として3つの新規化合物、ICA-riboside (ICAr)、ICAr-glucoside、*S*-ICAr-L-homocysteine（S-ICAr-H）を単離しており、これらはICAよりも弱い植物成長抑制活性を示すか、または活性を示さなかった[2]。

本研究では、SAHのアナログであるS-ICAr-Hに着目し、その存在意義について研究を進めてきた。SAHはSAMに由来することから、*S*-ICAr-L-methionine（S-ICAr-M）の存在を推測した。さらに、化学合成したS-ICAr-Mのメチル基供与体としての活性について検討した。



S-adenosyl-L-methionine (SAM) plays as a methyl donor in biological and biochemical events, and *S*-adenosyl-L-homocysteine (SAH) is formed after the donation of methyl group of SAM to a methyl acceptor.

“Fairy rings” is a disease in the lawn in which fruiting bodies of fungi appear after turfgrass grows and/or dies in a circle. Imidazole-4-carboxamide (ICA) is one of the fairy ring inducers and shows plant growth inhibitory activity[1]. Three metabolites, ICA-riboside (ICAr), ICAr-glucoside and ICAr-L-homocysteine (S-ICAr-H), were isolated from ICA-treated rice[2]. These compounds showed weaker plant growth inhibitory activity than ICA or no activity.

Since the structure of S-ICAr-H is similar to SAH, the research on the significance of the existence of S-ICAr-H was advanced. We presumed that S-ICAr-H was derived from *S*-ICAr-L-methionine (S-ICAr-M). In this study the endogeny of S-ICAr-M and its activity as a methyl donor were examined.

1) Choi, J.-H., Kawagishi, H. *et al. J. Agric. Food Chem.* **58**, 9956–9959 (2010).
2) Choi, J.-H., Kawagishi, H. *et al. Org. Lett.* **21**, 7841–7845 (2019).

S-adenosylmethionine, fairy ring, *Oryza sativa*
発表責任者：河岸洋和（kawagishi.hirokazu@shizuoka.ac.jp）

講演番号：3F07-06
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:30～ ミーティングルーム F

日本産ヒキガエルが有する耳腺毒成分, bufadienolide の多様性

Variation in Bufadienolide Composition of Parotoid Gland Secretion From Three Taxa of Japanese Toads

○井上 貴斗[1]、中田 隆[1,2]、サヴィツキイ アラン[3]、吉永 直子[1]、森 哲[4]、森 直樹[1] ([1]京大院農、[2]京都先端科学大バイオサイエンス、[3]ユタ州立大生物、[4]京大院理)
○Takato Inoue[1], Ryu Nakata[1,2], Alan Savitzky[3], Naoko Yoshinaga[1], Akira Mori[4], Naoki Mori[1] ([1]Grad. Sch. Agri., Kyoto Univ, [2]Dept. Bioscience and Biotech., Kyoto Univ. Adv. Sci., [3]Dept. Biol., Utah State Univ., [4]Grad. Sch. Sci., Kyoto Univ.)

【背景･目的】 *Bufo* 属のヒキガエルは捕食者に対する化学防御として、耳腺と呼ばれる組織で強心性ステロイド、bufadienolide 類 (BDs) を合成・蓄積する。日本本土には、アズマヒキガエル (*Bufo japonicus formosus*)、ニホンヒキガエル (*B. j. japonicus*)、ナガレヒキガエル (*B. torrenticola*) の 2 種 1 亜種が生息する。アズマヒキガエルがもつ BDs の化学構造の知見は多いが、これら日本産ヒキガエル 2 種 1 亜種の毒組成やその代謝についての知見はない。本研究では、これら 2 種 1 亜種のBDs 組成の類似点と相違点を明らかにし、その生態的・進化的意義を明らかにすることを目的とした。
【方法･結果】 日本各地で採集したヒキガエル (*N*=132) の耳腺液を MeOHで抽出し、LC/MS で網羅的に分析した。その結果、2 種 1 亜種全てから BDs が検出され、各種 NMR 解析より、普遍的な BDs 全 5 種を同定した。また、各個体の BDs 組成を階層的クラスター分析 (HCA) により比較した結果、2 種 1 亜種の BDs 組成は 5 つのクラスターに分かれた。また、このクラスタリングパターンは日本産ヒキガエルのミトコンドリアシトクロム *b* 遺伝子による系統樹とほぼ一致した (Igawa et al. 2006)。この結果は、ヒキガエルの BDs が特定の選択圧に反応して多様化したのではなく、進化の過程において中立的に変化してきたことを示唆する (Irwin et al., 1991; Martin and Palumbi, 1993)。

Toads of the genus *Bufo* synthesize and accumulate bufadienolides (BDs) in their parotoid glands as a chemical defence against the toads' predators. Three bufonid taxa occur in mainland Japan, *Bufo japonicus formosus*, *B. j. japonicus*, and *B. torrenticola*. The chemical structures of BDs isolated from *B. j. formosus* are well known, but there is no further information on the BDs of Japanese toads and their metabolism. In this study, we analyzed BDs of toads from throughout Japan and compared the BD profiles by LC/MS and hierarchical cluster analysis (HCA). We observed BDs in three taxa of Japanese toads, and identified five of the most common BDs by NMR analyses. HCA of individual BD profiles divided the three taxa into five clusters. This result indicates that BD profiles differ both among and within the taxa. The clustering pattern of BDs is generally concordant with a phylogenetic tree reconstructed from the mitochondrial cytochrome *b* gene of Japanese toads. Our results suggest that the BDs of Japanese toads have diversified not in response to specific selective pressures.

Biotoxin, Bufadienolide, Bufo

発表責任者：井上貴斗（chem-riku.it@outlook.jp）

講演番号：3F07-07
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:30～ ミーティングルーム F

イネがもつ (*R*)-β-tyrosine 量の時間的変動

Temporal fluctuations of (*R*)-β-tyrosine content in rice

○阪本 駿太、吉川 貴徳、寺石 政義、吉永 直子、小野 肇、森 直樹（京都大農）
○Shunta SAKAMOTO, Takanori YOSHIKAWA, Masayoshi TERAISHI, Naoko YOSHINAGA, Hajime ONO, Naoki MORI (Kyoto Univ.)

イネジャポニカ種 (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*) は非タンパク性アミノ酸 (*R*)-β-tyrosine (Fig.1) を産生すると我々は明らかにしている (Yan et al., 2015). しかし，その生理的・生態的意義は不明である．二次代謝物には，その機能に応じて蓄積量が時間的に変動する場合がある (Nakagawa et al., 1995; Goodspeed et al., 2012). そこで，本研究では (*R*)-β-tyrosine 蓄積量の生育段階での変動および日周変動を調べた．

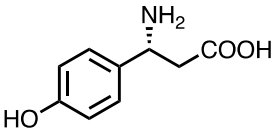


Fig.1 (*R*)-β-tyrosine

イネ（品種日本晴）の地上部を凍結破砕し，その 80% MeOH 抽出液をアミノ酸誘導体化試薬 AQC と反応させて LC/MS 分析に供した．はじめに，各生育段階（第 3, 5, 7 葉完全展開期）の蓄積量を比較すると，第 5 葉完全展開期以降に (*R*)-β-tyrosine が蓄積した．また，第 5 葉完全展開期イネでは，第 5 葉にもっとも多く (*R*)-β-tyrosine が蓄積した．次に，第 5 葉完全展開期イネにおける (*R*)-β-tyrosine 蓄積量の日周変動を調べると，他のアミノ酸とは異なり，一定であった． (*R*)-β-tyrosine 蓄積量はジャスモン酸処理により増加する (Yan et al., 2015). 現在，第 5 葉完全展開期イネの第 5 葉に傷害を与えた際の (*R*)-β-tyrosine 蓄積量の変化を分析中である．

Japonica rice cultivars produce non protein amino acid, (*R*)-β-tyrosine (Yan et al., 2015). However, function(s) of (*R*)-β-tyrosine in rice is still unknown. It is well known that the level of some secondary metabolites fluctuates temporally depending on their functions (Nakagawa et al., 1995; Goodspeed et al., 2012). Therefore, we measured (*R*)-β-tyrosine content in rice at different growth stages and time of day.

After flash-frozen and crushed, each sample was extracted with 80% methanol. The extracts were derivatized with AQC reagent and analyzed with LC-MS. First, we measured (*R*)-β-tyrosine content in rice at different growth stages. This experiment showed that rice at the fifth and seventh leaf stage contains more (*R*)-β-tyrosine than one at the third leaf stage. Next, we quantified (*R*)-β-tyrosine in each leaf from rice at the fifth leaf stage. Through this experiment, we revealed that (*R*)-β-tyrosine are most abundant in the fifth leaf. Finally, we found that (*R*)-β-tyrosine content in rice at the fifth leaf stage was constant through the day, and this constancy was specific for (*R*)-β-tyrosine among amino acids. Because jasmonic acid treatment increases the amount of (*R*)-β-tyrosine in rice seedlings (Yan et al., 2015), we are now conducting wounding treatment to the fifth leaf.

(*R*)-β-tyrosine, temporal fluctuations, growth stages

発表責任者：阪本駿太（sakamoto.shunta.44m@st.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3F07-08
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:30～ ミーティングルーム F

リンゴ果実の酵素・基質両誘導型の食害応答性防御機構の解明

The dual defense system of apple fruits against feeding damage

○大畑 勇統[1]、吉永 直子[1]、石栗 陽一[2]、森 直樹[1]（[1]京都大院・農、[2]青森産技セ　りんご研）
○Yuto OHATA[1], Naoko YOSHINAGA[1], Yoichi ISHIGURI[2], Naoki MORI[1]（[1]Kyoto Univ., [2]AITC Apple Research Institute）

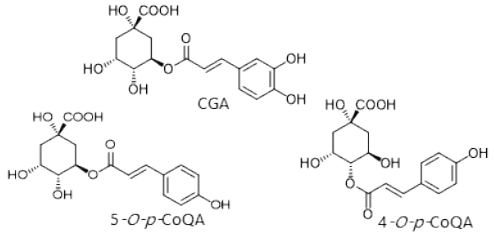


Fig. 食害部で誘導されるクロロゲン酸類

リンゴ果実は様々な昆虫の食害を受ける．中でもモモシンクイガ *Carposina sasakii* の幼虫は果実内に食入し，種子や果肉を食害するリンゴの重要害虫である．先行研究で，リンゴ果実が樹になった状態（着果）と樹から摘み取った状態（摘果）で生育したときのモモシンクイガの生存率は，両者で大きく異なり，摘果に比べ着果で極めて低かった。我々は着果状態でモモシンクイガ幼虫の食害に応答してクロロゲン酸類（chlorogenic acid, *p*-coumaroylquinic acid (*p*-CoQA)）が誘導されると明らかにした．これらは食害部近傍に局所的に誘導されるため，食害部で何らかの生理的役割を果たすと考えられる．

今回，着果食害部で誘導される *p*-CoQA 異性体 2 種について詳細に分析した結果，5-*O*-*p*-CoQA が選択的に誘導されると分かった．また，食害部のペルオキシダーゼ活性を測定すると，着果状態でのみ食害部局所的に顕著に上昇した．本講演では，食害部で誘導されるクロロゲン酸類とペルオキシダーゼの酵素反応物の構造解析とモモシンクイガ幼虫への生理活性について報告する．

Apple fruits are damaged by various insects. Among them, *Carposina sasakii* is an important pest of apples in which larvae ingest into fruits. Comparing the survival rates of *C. sasakii* in on-tree and picked fruit, it was found that the survival rate in the on-tree fruits was extremely low. We have shown that chlorogenic acid derivatives (chlorogenic acid, *p*-coumaroylquinic acids) are induced by feeding damage in the unpicked fruits. Since these are locally induced around the damaged area, they are considered to play some physiological role.

As a result of detailed analysis of the *p*-coumaroylquinic acid isomers induced around the damaged area, it was found that 5-*O*-*p*-coumaroylquinic acid is induced selectively. In addition, peroxidase activity around the feeding-damaged area increased drastically. In this talk, we will report on the structural analysis of peroxidase products of chlorogenic acid derivatives and the physiological effects on the larvae of *C. sasakii*.

defense system, apple fruit, chemical ecology

講演番号：3F07-09
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:30～ ミーティングルーム F

モモシンクイガに対するサポナイトの産卵抑制機構の解明

Oviposition inhibitory mechanism of saponite against *Carposina sasakii*

○室賀 邦太朗[1]、風間 春奈[1]、石栗 陽一[2]、江口 美陽[3]、加島 幸二[4]、黒坂 恵一[4]、吉永 直子[1]、森 直樹[1] ([1]京大院農、[2]青森産技セ　りんご研、[3]物材機構、[4]クニミネ工業株式会社)
○ Kunitaro MUROGA[1], Haruna KAZAMA[1], Yoichi ISHIGURI[2], Miharu EGUCHI[3], Koji KASHIMA[4], Keiichi KUROSAKA[4], Naoko YOSHINAGA[1], Naoki MORI[1] ([1]Kyoto Univ., [2]AITC Apple Research Institute, [3]NIMS, [4]Kunimine Industries)

モモシンクイガ *Carposina sasakii* はリンゴ栽培における重要な害虫である．成虫は果実由来の香気成分 (化学刺激) をもとに果実を定位し，果実の毛じ (物理刺激) に産卵する．孵化した幼虫は果実内に食入するため外部からの薬剤散布による制御が難しく，より効果的な防除法が求められている．本研究では，新たな防除法として揮発成分などの有機物の吸着能をもつ粘土鉱物サポナイトの塗布による，産卵抑制効果について検討した．

サポナイト溶液を果実表面に塗布し，未処理果実との産卵数を比較して産卵抑制効果の有無を調べたところ，15 mg/mL 以上の溶液濃度で有意に産卵数が減少した．また，電子顕微鏡で果実表面の微細構造を観察した結果，サポナイトの塗布により果実の毛じが果皮に張り付く様子が見られた．さらに GC-MS で果実の香気成分を分析した結果，成虫の触覚応答がある果実の香気成分が減少することを明らかにした．

本講演では，サポナイト処理によるモモシンクイガの産卵抑制効果と，果実の化学的，あるいは物理的な産卵刺激に対する影響について報告する．

The peach fruit moth, *Carposina sasakii*, is a serious fruit-boring pest of apples. The female moths locate the fruit relying on apple volatiles (chemical stimulation) and lay eggs on the fruit hairs (physical stimulation). Since the hatched larvae feed into the fruit, spraying chemicals on the fruit does not work enough. In this study, Saponite coating on fruits was investigated as a new method to inhibit the oviposition. Saponite is the clay mineral, which adsorbs volatile components.

Coating fruits with saponite solution, and the air-dried fruits were used in the assay. In a small cage, 5 pairs of the moths were set with intact and saponite-coated fruits. After the overnight assay, the number of layed eggs were counted and compared with that of intact fruits. At the concentration above 15 mg/mL, the saponite treatment significantly reduced the number of eggs. With electron microscopy observation, it was found that the hair of the fruit stuck to the pericarp. And the results of GC-MS analysis showed that the volatile components of the fruit were importantly reduced by saponite treatment.

In this talk, we discuss ovipositional suppression, and negative effects of saponite on chemical/physical stimuli of apple fruits.

Saponite, *Carposina sasakii*, Apple

発表責任者：吉永直子（yoshinaga.naoko.5v@kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3F07-10
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:30～ ミーティングルーム F

超臨界流体クロマトグラフィーと結晶スポンジ法を連結した分析系による微量香気成分の一斉構造解析

Simultaneous structural analysis of trace amounts of volatile compounds by supercritical fluid chromatography coupled to crystalline sponge X-ray analysis.

○北田 直也、三輪 真由佳、谷口 慈将 (キリン HD キリン中央研)
○NAOYA KITADA, MAYUKA MIWA, YOSHIMASA TANIGUCHI (Kirin Holdings)

【序論】我々の身の回りの香りは、その構成成分である低分子有機化合物の絶対立体配置を含む構造によって香気・香質・生理活性などが大きく変化することが知られており、香気成分のキラルサイエンスは研究分野として注目を集めている。香気成分の中には微量で嗅覚受容体の閾値を超える化合物もあるが、その揮発性の高さ故に実験操作中に失われやすく、微量香気成分の絶対立体配置を含む構造決定はこれまで難しかった。一方、我々はこれまでに超臨界流体クロマトグラフィー（以下 SFC）と結晶スポンジ（以下 CS）法を連結すること（SFC-CS 法）で、多成分試料における解析対象化合物の分離から絶対立体配置の決定までを高速でシームレスに実現できることを示している [1)]。そこで本研究では、香気成分混合試料に対して SFC-CS 法を適用し、微量香気成分の構造決定を試みた。
【方法・結果】テルペン化合物混合溶液に対し、SFC を用いて各化合物を分離し、CS（$[(ZnCl_2)_3 \cdot (tpt)_2]_n$、tpt=2,4,6-tris(4-pyridyl)-1,3,5-triazine）の入ったバイアルにダイレクトに分取した。そのまま単離した化合物を CS 細孔内部へ浸透させ、CS を単結晶 X 線回折装置にマウントして分析を行った。回折データを精密化した結果、混合試料に含まれる全てのテルペン化合物の絶対立体配置を含む構造決定に成功した。これより、揮発性の高い微量香気成分に対してシームレスな SFC-CS 法を応用することで、絶対立体配置を含む構造決定が高速かつ容易に可能であることが示された。

1) 第 31 回クロマトグラフィー科学会（静岡産業経済会館、2020 年 11 月 18–20 日）

Since the absolute configuration of volatile organic compounds can significantly change quality and bioactivity of aroma, determination of their stereochemistry has attracted a great deal of attention. However, due to their high volatility, absolute structure elucidation has been difficult at trace level. Recently, we have developed a powerful analytical platform, namely, supercritical fluid chromatography (SFC) coupled to crystalline sponge (CS) X-ray analysis (SFC-CS) allowing separation, isolation and structural elucidation of a target compound in a successive manner. In this study, we analyzed a mixture of volatile terpenes by SFC-CS and could readily characterize all compounds, including absolute configuration. The results show a potential that SFC-CS characterizes various unidentified volatile compounds and significantly contributes to progress of aroma science.

crystalline sponge method, supercritical fluid chromatography, volatile organic compounds

発表責任者：北田直也（Naoya_Kitada@kirin.co.jp）

講演番号：3F07-11
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:30～ ミーティングルーム F

超臨界流体クロマトグラフィーと結晶スポンジ法を連結した分析系における極性溶媒耐性結晶スポンジの活用

Application of crystalline sponges resistant to polar solvents in supercritical fluid chromatography coupled to crystalline sponge X-ray analysis

○三輪 真由佳、北田 直也、谷口 慈将（キリン HD キリン中央研）
○Mayuka MIWA, Naoya KITADA, Yoshimasa TANIGUCHI (Kirin Holdings)

【背景・目的】我々は、超臨界流体クロマトグラフィー（以下 SFC）と結晶スポンジ（以下 CS）法を連結することで、多成分試料における構造解析対象化合物の分離、単離、構造決定がシームレスに実現できることを示している（SFC-CS 法）[1]。一方、先行研究で用いた $ZnCl_2$ と 2,4,6-tris(4-pyridyl)-1,3,5-triazine（tpt）から作製した CS（$[(ZnCl_2)_3\cdot(tpt)_2]_n$）は MeOH や MeCN に耐性が無いため、SFC-CS 法を実施する際の移動相モディファイア溶媒に制約が伴う。そこで、本研究ではこれらの溶媒に耐性のある CS を探索し、モディファイアを限定しない SFC-CS 法の実現を目指した。
【結果】金属イオン、リガンドの組合せとして CuBr と benzene-1,3,5-triyl triisonicotinate から作製した CS[2]、および $Co(NO_3)_2\cdot6H_2O$、4,4'-bipyridine、(*R*)-mandelic acid（若しくは(*S*)-mandelic acid）から作製した CS[3]がそれぞれ MeOH、MeCN に耐性があることを見出した。これらの CS を活用することで、モディファイアを限定することなく SFC-CS 法が可能となり、位置異性体や立体異性体混合物の分離と構造決定という難易度の高い解析を極めて迅速に実現できることを示した。

1) 第 31 回クロマトグラフィー科学会（静岡産業経済会館、2020 年 11 月 18–20 日）
2) Chem. Asian J., 2017, 12, 208–211
3) J. Am. Chem. Soc., 2015, 137, 12045–12049

Introduction: Supercritical fluid chromatography (SFC) coupled to the crystalline sponge (CS) X-ray analysis is a powerful analytical platform for separation, isolation and structural elucidation of a target compound. However, $[(ZnCl_2)_3\cdot(tpt)_2]_n$ (tpt=2,4,6-tris(4-pyridyl)-1,3,5-triazine), the CS used in our previous study, is incompatible to MeOH and MeCN which frequently compose mobile phase in SFC as a modifier. To improve versatility of SFC-CS analysis, we explored the CS resistant to MeOH and MeCN.
Results: We found that CS made from CuBr and benzene-1,3,5-triyl triisonicotinate is resistant to MeOH and that CS made from $Co(NO_3)_2\cdot6H_2O$, 4,4'-bipyridine and (*R*)-mandelic acid (or (*S*)-mandelic acid) is resistant to MeCN. Utilizing these CS allowed SFC-CS analysis without limiting the modifier in SFC, and we showed very rapid separation and structural elucidation of positional and stereo isomers, which was quite arduous in a conventional analytical way.

crystalline sponge method, supercritical fluid chromatography, metal organic frameworks

発表責任者：三輪　真由佳（Mayuka_Miwa@kirin.co.jp）

講演番号：3F07-12
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:30～ ミーティングルーム F

求核性化合物の解析を可能とする拡張結晶スポンジ法の開発

An expansion of crystalline sponge X‐ray analysis to elucidate the molecular structure of nucleophilic compounds

○谷口 慈将、松本 理恵、門田 智之（キリン HD キリン中央研）
○Yoshimasa TANIGUCHI, Rie MATSUMOTO, Tomoyuki KADOTA (Kirin Holdings)

結晶スポンジ法は構造解析対象化合物を結晶化することなく X 線構造解析を可能とする新しい分子構造解析手法である[1]。その原理は結晶スポンジ（CS）と呼ばれる細孔性金属有機構造体単結晶に解析対象化合物（ゲスト）の溶液をソーキングさせ、ホストーゲスト相互作用によりゲストを細孔内に捕捉、周期配列させることで X 線により構造観測するものである。これまでに 2,4,6-tri(pyridine-4-yl)-1,3,5-triazine（tpt）とハロゲン化亜鉛から構成される CS（$[(ZnX_2)_3\cdot(tpt)_2]_n$）にて多数の新規化合物の立体構造決定がなされている。一方で塩基性、求核性の高いゲスト化合物は CS を破壊してしまうためこれまで分析が困難であった。我々は、ゲストソーキング時にゲストとイオンペア形成可能な試薬を同時添加することで、ゲストの反応性を低下させ CS の破壊を防ぎ、細孔内にトラップされたイオンペア形成したゲストを観測することに成功した[2]。開発手法は極めて簡便に CS 法適用可能化合物範囲を拡大するものである。医薬品等の機能性化合物は塩基性、求核性官能基を有するものが多く、開発手法を活用することで研究開発が加速すると期待される。本会では開発手法の有効性を示す具体的な解析例を紹介する。

1) Nature 2013, 495, 461–466
2) Chem. Eur. J. 2020, 26, 15799–15803

The crystalline sponge (CS) method allows structural elucidation of a target compound (guest) by the X-ray diffraction spectroscopy without the need to prepare single crystals of the guest compound. In principle, the CS method is inapplicable to reactive compounds that break the CS framework, such as highly basic, or nucleophilic ones. We disclosed a solution to this problem wherein an ion pair of the guest compound is formed during the guest-soaking step by adding a suitable reagent. The ion pair can be observed and does not damage the CS framework. The developed ion-pair-soaking method is simple and expands the range of compounds applicable to the CS method. Considering that many pharmaceuticals contain basic or nucleophilic functional groups, the developed method will be practically applied to structure analysis for product development and quality assurance in the industries. We will give specific examples using the developed method in the JSBBA 2021 annual meeting.

crystalline sponge method, ion pair, structure elucidation

発表責任者：谷口慈将（Yoshimasa_Taniguchi@kirin.co.jp）

講演番号：3F07-13
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:30～ ミーティングルーム F

頭皮常在菌の制御を目的とした天然成分の探索

Search for natural compounds for the purpose of controlling scalp flora

○門脇 航[1]、本田 沙理[1]、渡邉 紘介[2]、伊藤 廉[2]、熊澤 茂則[1] ([1]静岡県大院薬食、[2]ミルボン株式会社)
○Wataru KADOWAKI[1], Sari HONDA[1], Kosuke WATANABE[2], Len ITO[2], Shigenori KUMAZAWA[1] ([1]University of Shizuoka, [2]MILBON Co.)

ヒトマイクロバイオームと呼ばれるヒト共生細菌叢はヒトの健康状態や多くの疾病に関与している。ヒトの口腔内や腸内、皮膚などには数百兆個もの常在菌が生息しており、身体状態の変化が細菌叢に影響を与えることが知られている。ヒトマイクロバイオーム研究はこれまでにも多く行われており、腸内細菌叢と自然免疫系との関係性については多く報告されている。また、皮膚細菌叢においても同様に免疫応答系への関与が報告されており、肌に関する細菌叢の研究は広く行われている。一方で、頭皮細菌叢 (スカルプフローラ) についての研究例はほとんどなく、スカルプフローラは未知な部分が多い。そこで我々は、スカルプフローラに関する研究を行い、抜け毛や白髪の増加と関連する頭皮の慢性的な炎症が、頭皮常在菌である *Corynebacterium* 属細菌の増加によるものであることを明らかにした。さらに、この *Corynebacterium* 属細菌の増殖を抑制する植物の探索を行った結果、4 種のシソ科植物に増殖抑制活性があることを見出した。また、これらシソ科植物の *Corynebacterium* 属細菌増殖抑制活性を示す成分がロスマリン酸であることを明らかにした。

The human microbiome is involved in human health and various diseases. About hundreds of trillions of indigenous bacterium inhabit the oral cavity, intestines, and skin of humans. It is known that the physical condition of human affects the bacterial flora. Many studies on human microbiome have been performed on the relationship between the intestinal flora and the innate immune system. In addition, the skin bacterial flora has been reported to be also involved in the immune response system. As described above, many researches on the skin bacterial flora have been carried out in recent years. On the other hand, there are few studies on the scalp flora at the present. Thus, we have studied on scalp flora and have found that the chronic inflammation of the scalp related to hair loss and gray hair is due to increasing in *Corynebacterium* spp., which is an indigenous scalp bacterium. Furthermore, we searched various plants that suppress the growth of *Corynebacterium* spp., and we found that four species of Labiatae plants have the growth inhibitory activity against this bacterium. It was clarified that the component showing the activity of suppressing the growth of *Corynebacterium* spp. is rosmarinic acid.

Scalp flora, Corynebacterium, Rosmarinic acid

講演番号：3F07-14
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:30～ ミーティングルーム F

サソリ表皮由来の蛍光物質: CDPE の構造と蛍光特性の関係

The Relationship between Structure and Fluorescence Property of CDPE Identified from Scorpion Cuticle

○義本 裕介、宮下 正弘、中川 好秋、宮川 恒 (京大農)
○Yusuke YOSHIMOTO, Masahiro MIYASHITA, Yoshiaki NAKAGAWA, Hisashi MIYAGAWA (Kyoto Univ.)

サソリのもつユニークな形態的特徴として，その表皮の示す強い蛍光がある．この蛍光現象の生物学的意義は現段階では不明であるが，脱皮直後の個体はこのような蛍光を示さないことから，サソリ表皮の形成メカニズムへの関与が示唆されている．当研究グループではこれまでに，日本生息種のヤエヤマサソリ (*Liocheles australasiae*) およびマダラサソリ (*Isometrus maculatus*) の脱皮殻より，環状二量体フタル酸エステル構造を持つ蛍光物質 (以下 CDPE, Fig. 1) を単離・同定している (Yoshimoto, Y *et al.* 2020)．しかしながら，CDPE は典型的な蛍光物質のような多環芳香族骨格をもたず，また化合物によって吸収されない波長の光による励起で蛍光を示すなど，その構造と蛍光特性との関係については不明な点が多い．そこで本研究では，種々の CDPE 類縁体を合成し, 蛍光特性に与える影響を調べた. その結果, CDPE の蛍光は芳香環の分子内ならびに分子間相互作用 (エキシマー形成) によって増強されることが示唆された．さらにエネルギー計算による最安定配座の推定や, 金属イオンによる蛍光への影響の評価をおこなったところ, その結果はこの仮説を支持するものであった.

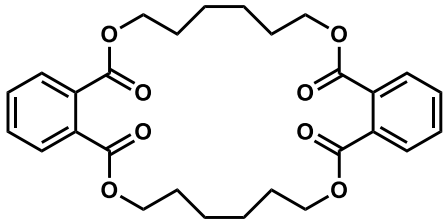


Figure 1. 蛍光物質 CDPE の構造.

Scorpions, excluding the family Chaerilidae, are known to fluoresce under UV light. Although the functions of the scorpion fluorescence remain unknown, it could be related to cuticle formation. In our previous study, we identified a novel fluorescent compound, which has a cyclic dimeric phthalate ester structure (CDPE, Fig. 1), from the scorpion, *Liocheles australasiae* and *Isometrus maculatus* (Yoshimoto, Y *et al.* 2020). However, CDPE does not have a polycyclic aromatic structure as observed in typical fluorescent compounds and shows fluorescence upon excitation by the light that is not absorbed. Therefore, the relationship between its structure and fluorescence properties is unclear. In this study, we synthesized several CDPE analogs and evaluated their fluorescence properties. The result suggests that CDPE shows strong fluorescence by intra- and intermolecular excimer formation. Calculation of the stable conformations and evaluation of the effect of metal ions on fluorescence of CDPE strongly supports this hypothesis.

Scorpion Fluorescence, Fluorescent Compounds, Natural Products Chemistry

講演番号：3F07-15
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:30～ ミーティングルーム F

ホタル生物発光を利用した新規近赤外発光材料の開発

Development of new luciferin analogues that emit near-infrared light through firefly bioluminescence

○神谷 弦汰[1]、北田 昇雄[1]、齊藤 亮平[2]、岩野 智[3]、宮脇 敦史[3]、平野 誉[1]、牧 昌次郎[1]([1]電気通信大学、[2]東京薬科大学、[3]理化学研究所)
○Genta KAMIYA[1], Nobuo KITADA[1], Ryohei SAITO[2], Satoshi IWANO[3], Atsushi MIYAWAKI[3], Takashi HIRANO[1], Shojiro MAKI[1] ([1]The university of electro-communications, [2]Tokyo university of pharmacy and life science, [3]RIKEN)

エネルギー効率の高いホタル生物発光は、ライフサイエンスの分野において応用されている。 In vivo 生体イメージング法もその一つである。ホタル生物発光は 560 nm の緑色発光を示す。しかし、生体イメージングの際に緑色発光は血液中のヘモグロビンや酸化ヘモグロビンにより吸収・散乱してしまう。そのため、血液による散乱・吸収の影響が小さい 650 nm – 850 nm の近赤外領域の発光波長が適いている。当研究室では、発光基質ルシェリンの構造改変を行う事で可視光領域を網羅するルシフェリンアナログの合成に成功し、その中で、675 nm の近赤外領域を示すルシフェリンアナログ Akalumine を開発した。また、2018 年には理化学研究所の岩野らにより、Akalumine に対する特化酵素 Akaluc が開発され、大型動物のリアルタイムイメージングを可能にした。本研究では、天然酵素 Fluc と 特化酵素 Akaluc において近赤外領域を示すルシフェリンアナログの開発を行い、その両方において 750 nm の発光波長を示すルシフェリンアナログ Gekiaka の合成に成功した。

Firefly bioluminescence produce highly efficient light caused by the reaction of the firefly luciferin catalyzed with firefly luciferase. Because of its high efficiency, firefly bioluminescence is utilized in life science applications as *in vivo* animal imaging. However, the yellow-green light emitted through natural firefly bioluminescence is not suitable for *in vivo* imaging, because this range of wavelength of light is absorbed and scattered by hemoglobin and oxidized hemoglobin in blood. Conversely, near-infrared (NIR) light (650–900nm) s less affected from absorption and scattering by blood, so it is more suitable for *in vivo* imaging. Our laboratory conducted studies on the structure–bioluminescence activity relationship and succeeded in synthesizing luciferin analogues that produce light in the visible region. In particular, a luciferin analogue emitting NIR light (675 nm) named AkaLumine was developed. In 2018, Iwano *et al.* developed Akaluc, the mutated enzyme of Fluc that specifically catalyzes bioluminescence reaction using Akalumine as a substrate. By using this Akaluc–Akalumine system, real-time imaging in large animals were succeeded.In the present study, we aimed to develop bioluminescent systems emitting light at wavelengths ≥700 nm; we thus synthesized luciferin analogues and evaluated their bioluminescence light using the natural enzyme Fluc and the artificial enzyme Akaluc. The synthesized luciferin analog GeKiaka showed 750 nm emission of light with both Fluc and Akaluc.

Bioluminescence, Near-infrared light, in vivo imaging

発表責任者：神谷　弦汰（kamiya0801@uec.ac.jp）

講演番号：3F07-16
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:30～ ミーティングルーム F

ホタルルシフェリンの新規波長制御技術

Synthesis of Novel Multicolor Luciferin Analogues

○土肥 広和[1]、神谷 弦汰[1]、北田 昇雄[1,4]、斎藤 亮平[2]、岩野 智[3]、平野 誉[1]、牧 昌次郎[1,4]([1]電通大情報理工、[2]東薬大薬、[3]理研、[4]電通大院脳医工)
○ Hirokazu DOHI[1], Genta KAMIYA[1], Nobuo KITADA[1,4], Ryohei SAITO[2], Satoshi IWANO[3], Takashi HIRANO[1], Shojiro MAKI[1,4] ([1]UEC, [2]TUPLS, [3]RIKEN, [4]UEC, CNBE)

ホタル生物発光は、発光基質ホタルルシフェリンが ATP、Mg^{2+}、O_2 存在下で酵素ルシフェラーゼより AMP 化され、続いて酸素化されることで、黄緑色（λ_{max} = 560 nm）の発光を示す。ライフサイエンスの分野において、ホタル発光系の非常に高効率な発光を活かし、生体内の細胞の動態を可視化する発光イメージング材料として応用されている。当研究室では、発光基質ホタルルシフェリンの構造を改変することにより、数多くのホタルルシフェリンアナログを合成し、その中で 675nm の近赤外発光を示すルシフェリンアナログ AkaLumine の開発に成功した。また、多彩な発光色を示す基質は様々な用途での応用が期待されており、波長・発光色の制御に次々と成功してきた。本研究では、AkaLumine の構造を一部改変することで、さらなる波長制御の技術を確立した。その中でも、700nm を超える発光を示すルシフェリンアナログの合成に成功した。本会では、この波長制御技術について詳細を発表する。

Firefly bioluminescence is a yellow-green (λmax = 560 nm) emission from the luminescent substrate firefly luciferin, which is AMP-transformed by the enzyme luciferase in the presence of ATP, Mg^{2+}, and O_2 and subsequently oxygenated. In the life sciences, firefly luminescence is used as a luminescent imaging material to visualize cell dynamics in living organisms by taking advantage of the extremely efficient luminescence of the firefly luminescent system. By modifying the structure of firefly luciferin, we have synthesized a number of firefly luciferin analogs and successfully developed a luciferin analog, AkaLumine, which emits near-infrared light at 675 nm. In addition, we have succeeded in controlling the wavelength and emission color of these substrates, which are expected to be used in various applications. In this study, we have established a technique for further wavelength control by modifying the structure of AkaLumine. Among them, we have succeeded in synthesizing luciferin analogs that exhibit luminescence beyond 700 nm. In this meeting, we will present the details of this wavelength control technique.

bioluminescence, firefly, imaging

講演番号：3G01-01
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:00～ ミーティングルーム G

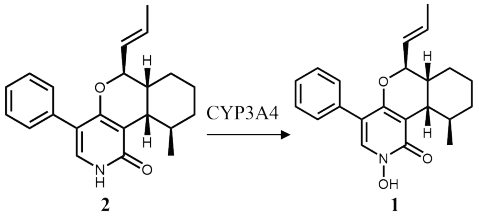
ヒト薬物代謝遺伝子を用いた糸状菌二次代謝物の多様性拡大法の確立とプロドラッグ型化合物の探索

Establishment of expanding chemical diversity for secondary metabolites isolated from filamentous fungi by using human genes, and searching for prodrugs

○岡本 拓実、岸本 真治、渡辺 賢二 (静岡県大薬)
○Takumi OKAMOTO, Shinji KISHIMOTO, Kenji WATANABE (Univ. Shizuoka)

糸状菌が生産している二次代謝物は多様な構造と生物活性を有している。本研究では、基質許容性の広いヒト薬物代謝酵素シトクロム P450（CYP）を用いることにより、代謝物多様性の拡大、優れた生物活性化合物の創出を目的に研究を行った。

最初に、CYP の *Aspergillus* 属糸状菌発現ベクターを作製し、各種 *Aspergillus* 属のウリジン要求性株を形質転換した。その後、形質転換株と非形質転換株（WT）の培養液の抽出物を LC-MS で網羅的に解析した。その結果、*Aspergillus flavus* A1421 株の CYP3A4 導入株において、WT では生産されない化合物を発見した。この化合物の化学構造を解明したところ、本化合物が leporin B (**1**)であると判明した。また、WT の培養液には **1** の生合成前駆体である leporin C (**2**)が蓄積していることも判明した。次に CYP3A4 酵素を用いた *in vitro* での変換反応を確認した。その結果、糸状菌内だけでなく生体内での変換を示唆する結果が得られた。これらより、本研究で見出した方法論は *Aspergillus* 属糸状菌の二次代謝物の多様性を広げ、有用な活性物質を発見する上で有効な手段であることが示唆された。



2 **1**

Secondary metabolites isolated from filamentous fungi have various structures and biological activities. By using human drug metabolism genes: Cytochrome P450 (CYP), is broad substrates tolerance as well as expected biosynthetic important compounds. Therefore, we conducted to research with the aim of expanding chemical diversity for secondary metabolites and discover new biological activity compounds.

First of all, we constructed CYP vectors with expressing in *Aspergillus* species and transformed to various *Aspergillus* species that require uridine. Next, the transformants were cultured and analyzed. As a result, we found compound isolated from transformant harboring the expression vector coding of CYP3A4. Based on the chemical structure of isolated compound, this compound was elucidated leporin B (**1**) along with the accumulation of leporin C (**2**) as a precursor of **1** was observed in the culture broth from WT. Next, we confirmed whether **2** is converted to **1** by using CYP3A4 enzyme. It was suggested that **2** can be converted to **1** not only *in vitro* but also *in vivo* assays. In conclusion, this methodology enables us to provide an efficient framework for expanding chemical diversity for secondary metabolites and finding new bioactivity compounds.

humanCYP, biotechnology, prodrug

発表責任者：岡本拓実（takumi@u-shizuoka-ken.ac.jp）

講演番号：3G01-02
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:00～ ミーティングルーム G

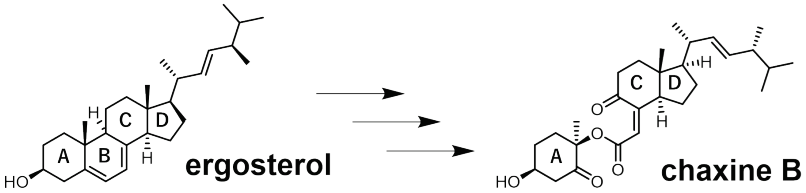
高等菌類の子実体形成促進物質 chaxine B の生合成研究

Biosynthetic study of chaxine B inducing fruiting body in higher microorganism

○難波 良太[1]、岸本 真治[1]、呉 静[2]、西川 俊夫[3]、守屋 央朗[4]、及川 英秋[5]、河岸 洋和[2]、渡辺 賢二[1] ([1]静岡県大薬、[2]静大グリーン研、[3]名大院生命農、[4]岡山大異分野融合研究コア、[5]北大院理)
○ Ryota NAMBA[1], Shinji KISHIMOTO[1], Jing WU[2], Toshio NISHIKAWA[3], Hisao MORIYA[4], Hideaki OIKAWA[5], Hirokazu KAWAGISHI[2], Kenji WATANABE[1] ([1]Univ. Shizuoka, [2]Shizuoka Univ., [3]Nagoya Univ., [4]Okayama Univ., [5]Hokkaido Univ.)

Agrocybe chaxingu から単離された chaxine 類は、ステロイド骨格の B 環が開裂し、A 環と C 環がエステル結合した特異な構造をもつ化合物である。[1] キノコの子実体形成促進作用を示すことや多くのキノコが産生することからキノコホルモンである可能性が示唆されているが、生合成メカニズムは解明されていない。そこで我々は chaxine 類の生合成の解明を目的とし研究に着手した。

2015 年に Chen らが *Aspergillus* 属糸状菌から chaxine 類を単離したという報告[2] を受け、研究室にて所持している様々な子嚢菌の菌体抽出液を LC－MS に供したところ、その全てで chaxine B と保持時間・MS/MS スペクトルが一致する化合物が検出された。そのなかでも出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* について、大量培養し精製後、NMR による解析を行ったところ、出芽酵母が chaxine B を産生していることが明らかになった。次に、出芽酵母の遺伝子欠損株ライブラリーを用いて chaxine 類の生合成に関与する遺伝子の探索を行ったところ、ergosterol の生合成に関与する遺伝子の変異株において chaxine 類の生合成に変化が確認された。本発表ではこれらの実験結果を元にした chaxine 類の生合成について報告する。



Chaxines have been originally isolated from *Agrocybe chaxingu*. Chaxine's B-ring of a steroid core is cleaved, and an A-ring is directly connected to a C-ring by ester bond[1]. This class of compound induces fruiting body formation and produced by various mushrooms thus they could be "mushroom hormone". To clarify the role of chaxines in the producing organisms, we try to uncover the biosynthetic pathway of chaxine.

First, we analyzed production of chaxines by *Ascomycetes* by LC—MS based on a previously reported isolation of chaxine B from *Aspergillus* sp. by Chen[2]. The production of chaxine B was observed from culture of a model organism *Saccharomyces cerevisiae.* To elucidate the biosynthetic pathway of chaxines, we governed a knock out experiment. Deletion of genes codeing ergosterol biosynthetic enzymes resulted in the loss of chaxine B. Analysis of the results suggest this type of compound could be synthesized from sterols in yeast.

1. Choi, J.-H. *et al. Tetrahedron Lett.* **2009**, *65*, 9850.　2. Chen, M. *et al. Chem. Biodivers.* **2015**, *19*, 1398.

biosynthesis, chaxine B, sterols

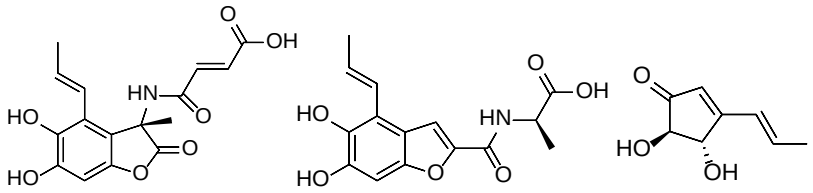
講演番号：3G01-03
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:00～ ミーティングルーム G

糸状菌由来天然物 fumimycin の特異な骨格に関する生合成研究

Biosynthetic study of fumimycin including novel core structure isolated from fungus

○南 歩実、岸本 真治、渡辺 賢二 (静岡県大薬)
○Ayumi MINAMI, Shinji KISHIMOTO, Kenji WATANABE (Univ. Shizuoka)

我々はヒト病原性糸状菌である *Aspergillus lentulus* ATCC MYA-3566 株の培養液中に、fumimycin（**1**）とそれによく似た分子式を持つ化合物 **2** を見出した。Fumimycin[1)]はその特異な構造にも関わらず生合成機構が未解明であるため我々は fumimycin と関連化合物の生合成経路の解明を目的とし研究に着手した。*A. lentulus* の培養液から fumimycin と分子式 $C_{15}H_{15}NO_6$ の化合物 **2** を単離し、NMR 解析および改良 Marfey 法により化合物 **2** を構造決定した後、これを lentofuranine と名付けた。Lentofuranine と fumimycin は同じ置換様式の芳香環とアラニンを含むことから、これらは同一の酵素によって生合成されていると考えられた。そこで、生合成遺伝子クラスターを特定するため芳香環を形成しうるポリケチド合成酵素（PKS）のノックアウト実験を行った。その結果 terrein（**3**）の生合成を担う PKS が二つの化合物の生合成も担うことが明らかとなった。しかし、本クラスター中にはアミノ酸の縮合にかかわる遺伝子が見い出されなかったため、異なる領域に存在する遺伝子が関与すると考えられた。現在、候補遺伝子の機能解析を行うとともに terrein 生合成遺伝子クラスター中のどの遺伝子が生合成に関与するのか、ノックアウト実験と異種宿主発現で検証中である。



Analysis of secondary metabolism of *Aspergillus lentulus* ATCC MYA-3566 enabled us to observe production of fumimycin (**1**) and unknown compound **2** in the culture medium. Planar structure of **2** was determined by NMR spectra and stereochemistry was determined by advanced Marfey's method. The backbone core of compound **2**, lentofuranine, was similar to that of fumimycin, suggesting they have the same biosynthetic pathway. Deficiency of PKS gene of *A. lentulus* abolished the production of fumimycin, lentofuranine and terrein (**3**). However, no gene encoding amino acid-activating enzyme could be found in the same gene cluster. The observation indicates that crosstalk of different biosynthetic pathways allows the synthesis of **1** and **2**.

1)Kwan, Y.-J. *et al. Org. Lett.* **2007**, *9*, 2449-2451.

secondary metabolite, antibiotics, fungi

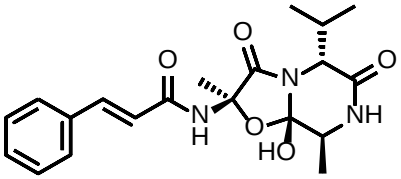
講演番号：3G01-04
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:00～ ミーティングルーム G

糸状菌 *Aspergillus lentulus* 由来新規化合物 lentopeptin 類の単離・構造決定および生合成解析

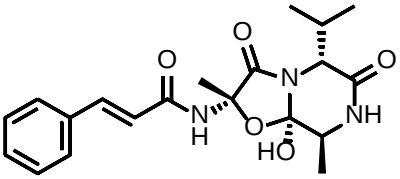
Isolation, structure elucidation and biosynthetic analysis of lentopeptins, novel compounds from *Aspergillus lentulus*

○松原 有也、岸本 真治、渡辺 賢二（静岡県大薬）
○Yuya MATSUBARA, Shinji KISHIMOTO, Kenji WATANABE (Univ. Shizuoka)

Aspergillus lentulus は *Aspergillus fumigatus* の近縁種として 2005 年に分離された[1]ヒト病原性糸状菌である。その全ゲノム配列中には未知の生合成遺伝子クラスター（BGC）が多数存在しているものの本菌由来二次代謝産物の報告例は少なく、新規な化合物が眠っている可能性が高いと考えられた。様々な培養条件の培養物を LC—MS 解析すると、他の *Aspergillus* 属糸状菌では報告例のない分子式 $C_{20}H_{25}N_3O_5$ を示す 2 種の化合物を本菌が産生していることが分かった。そこで本菌を大量培養し各種クロマトグラフィーを用いて各化合物を精製したのち、NMR スペクトル解析および改良 Marfey 法により構造決定を行った。これらはジアステレオマーの関係にある 2 つの新規化合物であり、lentopeptin A および B と命名した。これらの化合物の化学構造をもとに BGC を探索したところ、非リボソームペプチド合成酵素（nonribosomal peptide synthetase, NRPS）遺伝子をもつ BGC を見出した。見出された NRPS 遺伝子のノックアウトにより lentopeptin 生産の消失を確認したことから、これが lentopeptin 類の BGC であることが強く示唆された。



lentopeptin A



lentopeptin B

Aspergillus lentulus was isolated in 2005 [1]. This strain is a species of fungus in the genus Aspergill, and it has been reported as a cause of human disease [1]. Although many biosynthetic gene clusters (BGCs) have been found in the genome sequence of *A. lentulus*, only a few reports on secondary metabolism have been reported thus far. Here we isolate novel natural products from *A. lentulus* along with BGC responsible for the formation of the novel compounds. We found two new compounds by way of chemical screening with LC—MS analysis from the cultured *A. lentulus*. These compounds have the same molecular formula as $C_{20}H_{25}N_3O_5$, which has not been previously reported from *Aspergillus*, sp. We purified these compounds using various chromatographies and determined chemical structures of them by NMR spectrometric analysis as well as the advanced Marfey's method. These two compounds, lentopeptin A and B, are a pair of diastereomers. Based on the chemical structures, we found the BGC of lentopeptins. The proposed BGC contained NRPS gene. Knockout experiments of NRPS gene revealed an abolishment of producing lentopeptins suggested that this is the lentopeptin biosynthetic gene cluster.

1 Balajee S.A., *et al. Eukaryot. Cell* **2005**, *4*, 625-632.

biosynthesis, *Aspergillus*, secondary metabolite

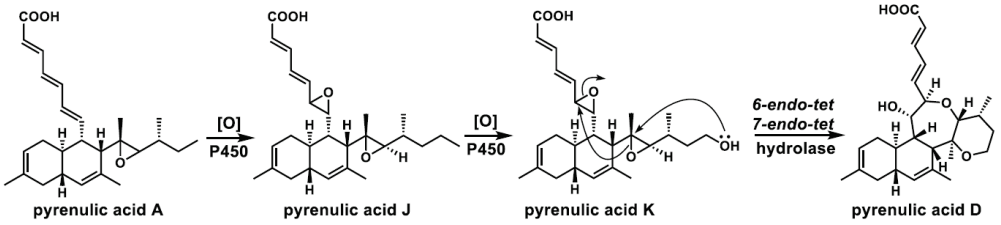
講演番号：3G01-05
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:00～ ミーティングルーム G

共生型子嚢菌 Pyrenula sp. に由来する pyrenulic acid 類の生合成研究

Biosynthetic study on pyrenlic acids from lichen mycobiont Pyrenula sp.

○伊藤 優衣[1]、佐藤 道大[1]、籠浦 倫美[1]、恒松 雄太[1]、竹仲 由希子[2]、棚橋 孝雄[2]、渡辺 賢二[1] ([1]静岡県立大薬、[2]神戸薬科大)
○Yui ITO[1], Michio SATO[1], Tomomi KAGOURA[1], Yuta TSUNEMATSU[1], Yukiko TAKENAKA[2], Takao TANAHASHI[2], Kenji WATANABE[1] ([1]Sch. Pharm. Sci., Univ. Shizuoka, [2]Kobe Pharm. Univ.)

ベトナム産地衣類由来の子嚢菌 *Pyrenula* sp.から単離された pyrenulic acid 類は, 6,7-縮環エーテルという特徴的な化学構造を有している[1]。この縮環エーテル構造の生合成は,エポキシドへの連続 *endo* 環化反応によると推定されているが, 解明には至っていない。そこで pyrenulic acid の生合成機構, 特にエポキシドの連続開環反応による 6,7-縮環エーテル構築メカニズムの解明を目指し研究に着手した。はじめに *Pyrenula* sp.の全ゲノム情報を解読し, pyrenulic acid 類の生合成遺伝子探索を行った。本化合物の化学構造から, その生合成には還元型の I 型 PKS, チオエステラーゼおよび酸化酵素が必須と考えられ, それらを含むクラスターに絞り込んだ。ついで, それらの遺伝子発現解析を行い, pyrenulic acid 生合成遺伝子クラスターを特定した。本クラスターにおける各遺伝子の機能を明らかにするため, *Aspergillus nidulans* を用いた遺伝子の異種発現による, 基質の変換活性を調べた。その結果, エポキシ化反応およびアルキル鎖末端メチル基の水酸化に関わる 2 つの酸化酵素をそれぞれ同定した。さらにこの末端アルコールからエポキシドへの連続 *endo* 環化反応を触媒する酵素を見出し, 6,7-縮環エーテル構造の構築を明らかにすることに成功した。



Pyrenulic acids are isolated from lichen mycobiont *Pyrenula* sp. collected in Vietnam, and possess a unique 6,7-fused bicyclic ether in the chemical structures. The ether ring is proposed to be constructed by the stereoselective epoxidation to double bonds of the polyketide intermediate followed by consecutive epoxide ring-opening reaction yielding diepoxy alcohol hydroxylation of the terminal alkyl chain. Here, we present whole genome sequencing of *Pyrenula* sp. and identification of the biosynthetic gene cluster of pyrenulic acids. Through the heterologous expression of the deduced genes using *Aspergillus nidulans* as a host, we have identified the gene cluster and found the enzymes catalyzing both reactors of epoxidation and hydroxylation. In addition, we successfully found an enzyme catalyzing the epoxide ring-opening to form the 6,7-fused bicyclic ether.

1. Tanahashi T. *et al. J. Nat. Prod.* **2014**, *77*, 1404-1412.

pyrenulic acid, 6,7-fused bicyclic ether, epoxidation

発表責任者：伊藤優衣（m17008@u-shizuoka-ken.ac.jp）

講演番号：3G01-06
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:00～ ミーティングルーム G

フェノール酸とブルーライトを併用した真菌の光不活性化

Photoinactivation of fungal conidia using blue light in combination with phenolic acids

○川阪 凱士、土屋 浩一郎、長宗 秀明、白井 昭博（徳島大学）
○Kaito KAWASAKA, Koichiro Tsuchiya, Hideaki Nagamune, Akihiro Shirai (Tokushima Univ.)

4 種類の真菌の胞子懸濁液（*Candida albicans*、*Cladosporium cladosporioides*、*Trichophyton mentagrophytes*、*Aspergillus niger*）に、フェノール酸類化合物であるフェルラ酸（FA）、バニリン酸（VA）、フェルラ酸メチルエステル（FAOMe）、カフェ酸、没食子酸、クマル酸、クロロゲン酸を添加し、ブルーライト（405 nm）照射下での殺菌力を評価した。その結果、全ての試験真菌に対して FA と FAOMe が 99%以上の殺菌力を示した。その殺菌メカニズムの解明を目的として、キシレノールオレンジを用いた比色法による過酸化水素の生成および電子常磁性共鳴（EPR）によりヒドロキシラジカルの生成を確認し、10% ジメチルスルホキシドを添加すると光殺菌力は低下した。さらに、高速液体クロマトグラフィーを使用して *A. niger* 分生子に対するフェノール酸の吸着量を測定した結果、殺菌効果を示した FA、FAOMe、VA が直ちに吸着することが分かった。これらの結果より、ブルーライトとフェノール酸の併用殺菌効果は、化合物の胞子吸着と活性酸素種の生成によって引き起こされることを示唆した。

Photofungicidal activity was investigated under blue light irradiation (wavelength, 405 nm) after addition of the phenolic acids, namely, ferulic acid (FA), vanillic acid (VA), ferulic acid methyl ester (FAOMe), caffeic acid (CaA), gallic acid, coumaric acid, and chlorogenic acid, to 4 types of fungal spore suspensions (*Candida albicans*, *Cladosporium cladosporioides*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Aspergillus niger*). Irradiation in the presence of FA or FAOMe showed more than 99% decrease in viability of all of tested fungi. To investigate the photofungicidal mechanism, the generation of hydrogen peroxide and hydroxyl radicals from the exposure of the phenolic acids to light were observed by colorimetric analysis with xylenol orange and electron paramagnetic resonance (EPR).The photofungicidality with FA, VA, and FAOMe on *A. niger* decreased in the presence of 10% DMSO. Moreover, the adsorption of phenolic acids to the conidia of *A. niger* was estimated using high-performance liquid chromatography. The results showed that FA, VA, and FAOMe adsorbed instantaneously to the conidia. Our results suggest that the photofungicidal efficacy of the combination of blue light with phenolic acids is caused by both reactive oxygen species generation and the adsorption of these compounds to the conidia.

spore, sterilization, led

発表責任者：川阪凱士（c702031013@tokushima-u.ac.jp）

講演番号：3G01-07
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:00～ ミーティングルーム G

Hitachimycin による出芽酵母細胞内 pH ホメオスタシス障害
Abrogation of intracellular pH by hitachimycin in budding yeast

○岩井 南会子[1]、南雲 陽子[2]、髙橋 壮太朗[3]、工藤 史貴[3]、江口 正[3]、臼井 健郎[2] ([1]筑波大学・生物学類、[2]筑波大学・生命環境、[3]東京工業大学・理学院化学系)
○Naeko IWAI[1], Yoko NAGUMO[2], Sotaro TAKAHASHI[3], Fumitaka KUDO[3], Tadashi EGUCHI[3], Takeo USUI[2] ([1]Dep. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, [2]Fac. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, [3]Dep. Chemistry, Tokyo Institute of Technology,)

【背景・目的】Hitachimycin は *Streptomyces* sp. KG-2245 株から単離された抗菌・抗腫瘍活性物質である[1]。これまでに本物質が酵母細胞膜上の P2-type H^+-ATPase である Pma1p を阻害することが報告されているが、直接の阻害なのか間接的な作用なのかは不明のままである[2]。そこで、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を用いて Pma1p の局在や活性について検討することとした。
【方法】多剤超感受性酵母 12geneΔHSR に対する hitachimycin の 50 %増殖阻害濃度 (IC_{50}) を算出した。次に IC_{50} 濃度付近での細胞内 pH、及び Pma1p 局在変動を、それぞれ酸性オルガネラに集積する quinacrine と Pma1p-yeGFP を用いて検討した。
【結果・考察】Quinacrine は通常液胞に蓄積するが、hitachimycin 処理細胞では細胞質に蓄積していたことから、本物質が細胞内 pH 恒常性を攪乱することが確認できた。また薬剤未処理では細胞膜や液胞に局在する Pma1p が、hitachimycin 処理で細胞質中にドット状に点在するように局在変化した。以上の結果は、hitachimycin が Pma1p の局在変動を誘導することで、細胞内 pH を攪乱する可能性を示唆している。現在、酵母膜画分を用いて hitachimycin が直接 Pma1p を阻害するかを検討しており、併せて報告する予定である。

【Background/purpose】Hitachimycin, a natural product isolated from *Streptomyces* sp. KG-2245. It has reported that hitachimycin inhibits Pma1p on the yeast plasma membrane, but it is not clear whether this compound directly inhibits Pam1p. Therefore, we investigate the effect of hitachimycin on the localization and the activity of Pma1p using the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*.
【Methods】Intracellular pH and the localization of Pma1p around IC_{50} value were investigated using quinacrine and Pma1p-yeGFP.
【Results/discussion】Quinacrine usually accumulates in the vacuole, but accumulated in the cytoplasm in hitachimcyn-treated cells, suggesting that this compound disrupts the intracellular pH homeostasis. Furthermore, Pma1p, a protein on plasma membranes, formed dot-like structures in the cytoplasm in hitachimcyin-treated cell. These results suggest that Hitachimcyin disturbs intracellular pH *via* inducing mislocalization of Pma1p.

【References】[1] *J. Antibiot.,* **41**, 614 (1988). [2] *J. Cheminform.,* **10**, 6 (2018).

hitachimycin, Pma1p, vacuole

発表責任者：臼井　健郎（usui.takeo.kb@u.tsukuba.ac.jp）

講演番号：3G01-08
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:00～ ミーティングルーム G

非共有結合性 TRPA1 アゴニストによるタイトジャンクション開口活性検討

Studies of the tight junction opening activities of non-electrophilic TRPA1 agonists

○向山 海凪[1]、南雲 陽子[2]、臼井 健郎[2]([1]筑波大学大学院・生命環境科学研究科、[2]筑波大学・生命環境系)
○Minagi MUKAIYAMA[1], Yoko NAGUMO[2], Takeo USUI[2] ([1]Grad. Sch. of Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, [2]Fac. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)

【背景・目的】TRPA1 は Ca^{2+}透過性のカチオンチャネルであり、様々な外因性物質によって活性化される。TRPA1 アゴニストには、共有結合して TRPA1 を活性化させる共有結合性アゴニストと、共有結合しない非共有結合性アゴニストの 2 つに大別される。我々はこれまでに、いくつかの共有結合性 TRPA1 アゴニストが上皮細胞の Tight Junction (TJ) を開口させることを報告してきた [1]。TJ は外界からの異物の侵入を防ぐバリア機能を担う一方で、バイオ医薬品の吸収障壁でもあり、TJ 開口剤はバイオ医薬品の透過吸収促進剤としての応用が期待される。しかしながら、共有結合性の TRPA1 アゴニストは刺激性の強さ等、安全性に課題が残る。そこで、食品や医薬品成分として使用されている非共有結合性 TRPA1 アゴニストに着目し、これらが TJ 開口を引き起こすか検討した。
【方法・結果】イヌ腎上皮細胞 MDCK II 細胞単層に対し、非共有結合性 TRPA1 アゴニストである menthol、carvacrol、および clotrimazole が TJ 開口を引き起こすか検討した。その結果、いずれの化合物も、それぞれ毒性を示さない濃度において TRPA1 活性化を介した TJ 開口活性を示すことを見出した。今回の結果は、非共有結合性 TRPA1 アゴニストが皮膚や粘膜を介した薬剤吸収促進剤として安全に利用できる可能性を示唆している。

【Background /purpose】TRPA1 is a Ca^{2+}-permeable cation channel that is activated by various exogenous substances. TRPA1 activators are largely classified into two groups: electrophilic activators and non-electrophilic activators. We have reported that some electrophilic TRPA1 activators induced tight junction (TJ) opening in epithelial cell monolayer [1]. In this study, we focused on non-electrophilic TRPA1 activators, including ingredients common in food and medication with established safety, and examined whether they cause TJ opening or not.
【Results】We found that the non-electrophilic TRPA1 agonists, menthol, carvacrol, and clotrimazole, enhance the TJ permeability in monolayers of the canine kidney epithelial cell line MDCK II via TRPA1 activation. These results suggest that non-electrophilic TRPA1 agonists might be candidates for drug absorption enhancers through the skin and mucous membranes with less side effects.

【References】[1] *Sci. Rep.,* **8**, 2251 (2018). [2] *J. Biochem.*, **168**, 407 (2020).

epithelial cell, tight junction, TRPA1

発表責任者：臼井健郎（usui.takeo.kb@u.tsukuba.ac.jp）

講演番号：3G01-09
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:00～ ミーティングルーム G

酵母ユビキチンリガーゼ *rsp5*^{A401E} 株の AZC ストレス下で生育回復活性を有する化合物の探索と評価
Screening and evaluation of compounds that restore the growth of yeast ubiquitin ligase *rsp5*^{A401E} strain under AZC stress

○松浦 秀太郎[1]、高木 博史[2]、木村 賢一[1]([1]岩手大院・総合科学、[2]奈良先端大・バイオサイエンス)
○Syutaro MATSUURA[1], Hiroshi TAKAGI[2], Ken-ichi KIMURA[1] ([1]Grad. Sch. of Arts and Sci., Iwate Univ., [2]Grad. Sch. of Biol. Sci., NAIST)

出芽酵母のユビキチンリガーゼ *rsp5*^{A401E} 株は、高温、プロリンの毒性アナログ（L-azetidine-2-carboxylic acid; AZC)、LiCl などのストレスで増殖阻害が生じる。我々はそれらの性質を利用し、各ストレスによる増殖阻害を回復させる化合物を探索している。その結果、高温ではカルシニューリン阻害剤の FK506 が、AZC では電子伝達系 complex Ⅲ阻害剤の antimycin A が、LiCl では糖鎖修飾阻害剤の tunicamycin がそれぞれヒットした。本研究では、化合物ライブラリーから AZC ストレスによる増殖阻害を回復させる物質を探索した結果について報告する。寒天プレート法の条件（4.2 x 10^5 cells/ml、0.1 mM AZC、28℃、3 日間培養）をもとに、液体培養法（50 µl/384 well、600 nm、30℃静置培養、3 日間）で 57,000 化合物のスクリーニングを行なったところ、19 サンプルに活性が認められた。対照化合物の antimycin A と、農薬の myxothiazol を含む 18 サンプルについて、液体培養法と寒天プレート法で比較したところ、明確な相関性は認められなかった。また、最も高い活性を示した化合物 0461 は、液体培養法で 0.04 µM の濃度で 50%増殖活性を示し、寒天プレート法では 0.078 nmol/spot の濃度で最小生育回復活性を示した。一方で、他の酵母に対して強い活性は認められなかったことから、特異性が高く農薬としての有効性が期待できる。

The *rsp5*^{A401E} mutant yeast cannot grow under various stresses such as high temperature, AZC (L-azetidine-2-carboxylic acid), and LiCl. We showed calcineulin inhibitor FK506 restored the growth at high temperature stress, complex III inhibitor antimycin A restored the growth when under AZC stress, and glycosylation inhibitor tunicamycin restored the growth under LiCl stress, respectively. In this study, we screened compounds in a chemical library (57,000 compounds) that could restore the growth inhibition due to the AZC stress. Efficient plate assay (50 µl / 384 well, 600 nm, 30°C static culture, 3 days) was performed based on the conditions of the agar plate assay (4.2 x 10^5 cells / ml, 0.1 mM AZC, 28 ° C, 3 days culture). Eighteen samples containing antimycin A and myxothiazol were evaluated for their specificity using 5 other mutant yeast strains. Compound 0461, which showed the highest activity, indicated growth-restoring activity at 0.04 µM in a plate assay and at 0.078 nmol / spot in the agar plate assay. It did not show strong activity against other mutant yeasts and is therefore expected to be a lead compound as a pesticide.

Saccharomyces cerevisiae rsp5^{A401E} strain, complex III inhibitor, L-azetidine-2-carboxylic acid

発表責任者：木村賢一（kimurak@iwate-u.ac.jp）

講演番号：3G01-10
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:00～ ミーティングルーム G

ドイツ産琥珀と久慈産琥珀の生物活性物質の構造と活性の比較研究

Comparative study of the structure and biological activity of German and Kuji amber constituents.

○鈴木 瑞季[1]、井上 奈々[2]、田中 来実[1]、CESAR Menor-Salvan[3]、越野 広雪[4]、木村 賢一[1]([1]岩手大・農、[2]岩手大院・総合科学、[3]University of Alcala、[4]理研・CSRS)
○ Mizuki SUZUKI[1], Nana INOUE[2], Kurumi TANAKA[1], Menor-Salvan CESAR[3], Hiroyuki KOSHINO[4], Ken-ichi KIMURA[1] ([1]Fac. of Agri., Iwate Univ., [2]Grad. Sch. of Arts and Sci., Iwate Univ., [3]University of Alcala, [4]RIKEN CSRS)

ドイツ産琥珀（Geiseltal、約 4500 万年前）の生物活性物質を、Ca^{2+}シグナル伝達に関わる遺伝子破壊酵母 YNS17 株の生育回復活性で直接単離精製し、GC/MS による分析の結果と比べながら構造を決定し、これまで明らかにしてきた他国産琥珀由来の生物活性物質と比較することを目的とした。ドイツ産琥珀のメタノール抽出物 430 mg をシリカゲル TLC（ヘキサン：酢酸エチル＝3：1）で 13 画分に分画後、逆相 HPLC（85 %MeOH）にてピーク A、B、C をそれぞれ 8.8 mg、10.8 mg、13.3 mg 単離精製した。化合物 A、B、C は、HR-EI-MS により $C_{30}H_{50}O_2$（442）、$C_{29}H_{46}O_2$（426）、$C_{30}H_{48}O_2$（440）と決定し、B は 1 次元、2 次元 NMR 等の各種機器分析により、新規の 16β-hydroxy-24-nor-12-ursen-3-one と決定した。一方 A と C は、GC/MS スペクトルと一致したため 1 次元 NMR を測定し、既知の urs-12-ene-3β,16β-diol、並びに 16β-hydroxy-12-ursen-3-one と同定した。これら 3 種はトリテルペノイド構造を基本としており、これまで琥珀から単離してきたジテルペノイド（ノルジテルペノイド）とは異なる上、久慈産琥珀以外の外国産琥珀で初めて新規物質（ノルトリテルペノイド）が単離された。また、構成成分から、ドイツ産琥珀の起源樹はカンラン科（*Burseraceae*）に起因すると予想された。なお、化合物 A、B、C は YNS17 株に対し、久慈産琥珀から単離された kujigamberol よりも低濃度の 0.03 μg/spot まで生育回復活性を示した。

Biological active compounds were isolated from German amber（Geiseltal）using growth-restoring activity of a mutant yeast strain involving Ca^{2+}-signal transduction. Three kinds of biological active compounds (A, B and C) were isolated from the MeOH extract of German amber using silica gel TLC (hexane:ethyl acetate=3:1) and HPLC (ODS, 85 % MeOH). B was obtained at 10.8 mg and elucidation of its structure revealed as a new compound, 16β-hydroxy-24-nor-12-ursen-3-one. A and C were obtained at 8.8 mg and 13.3 mg are identified as known compounds, urs-12-ene-3β,16β-diol and 16β-hydroxy-12-ursen-3-one, respectively, as indicated by GC/MS analysis and 1D NMR. The identified triterpenoids and nortriterpenoid are different from those isolated from Baltic and Kuji ambers. This could be due to both the botanical origin of the Geiseltal resinite, which is postulated as angiosperms of the *Burseraceae* family, and also to the diagenetic history and very good preservation of the resin material, which are in pre-amber stage. Compounds A, B and C showed stronger growth-restoring activity against the mutant yeast than that of the main detected to date compound isolated from Kuji amber, kujigamberol.

German amber, triterpenoid, 16ß-hydroxy-24-nor-12-ursen-3-one

発表責任者：木村賢一（kimurak@iwate-u.ac.jp）

講演番号：3G01-11
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:00～ ミーティングルーム G

Chemical induction of fungal secondary metabolism toward production of novel bioactive secondary metabolites

○Islam Adel Abdelhakim Amin[1,2,3], Takayuki Motoyama[1], Yushi Futamura[1], Hiroyuki Osada[1]
([1]Chemical biology, RIKEN CSRS, Japan, [2]Saitama Univ., Japan, [3]Assiut Univ., Egypt)

Abstract

Filamentous fungi are prolific source of great diversity of bioactive drugs however, its real biosynthetic potential is largely unexplored due to high percent of cryptic biosynthetic gene clusters (BGCs). Small molecules elicitation is a simple approach easily applied to various microbial culture that can not only activate silent BGCs, but also may alter a specific pathway resulting in novel metabolites. We used a recently discovered secondary metabolism regulator (NPD938) to activate/alter secondary metabolism in *Fusarium* sp. RK97-94 which is a producer of the antimalarial compound lucilactaene. LC-MS analysis revealed that NPD938-treated cultures accumulated two new lucilactaene like compounds that were not produced by control. These induced metabolites were successfully purified and fully identified by UV, MS and NMR analysis as dihydroNG393 **(1)** and dihydrolucilactaene **(2).** The later displayed a very potent antimalarial activity (IC_{50} 4.5 ng/ml) however, dihydroNG393 **(1)** exhibited moderate activity (IC_{50} 26 µg/ml), providing insight into the structure activity relationship of lucilactaene and its analogues as antimalarial drug candidates.here.

Secondary metabolism, Antimalarial activity, Chemical activation

発表責任者：Hiroyuki Osada（osadahiro@riken.jp）

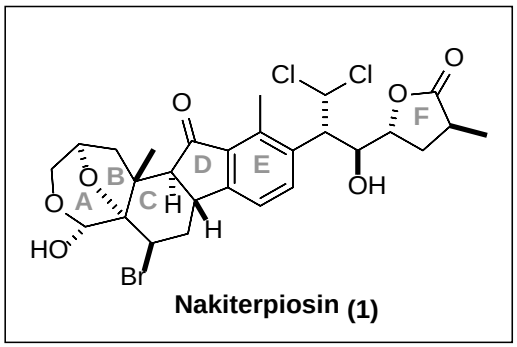
講演番号：3G01-12
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:00～ ミーティングルーム G

ナキテルピオシン側鎖部の合成研究

Synthetic study of side chains of Nakiterpiosin

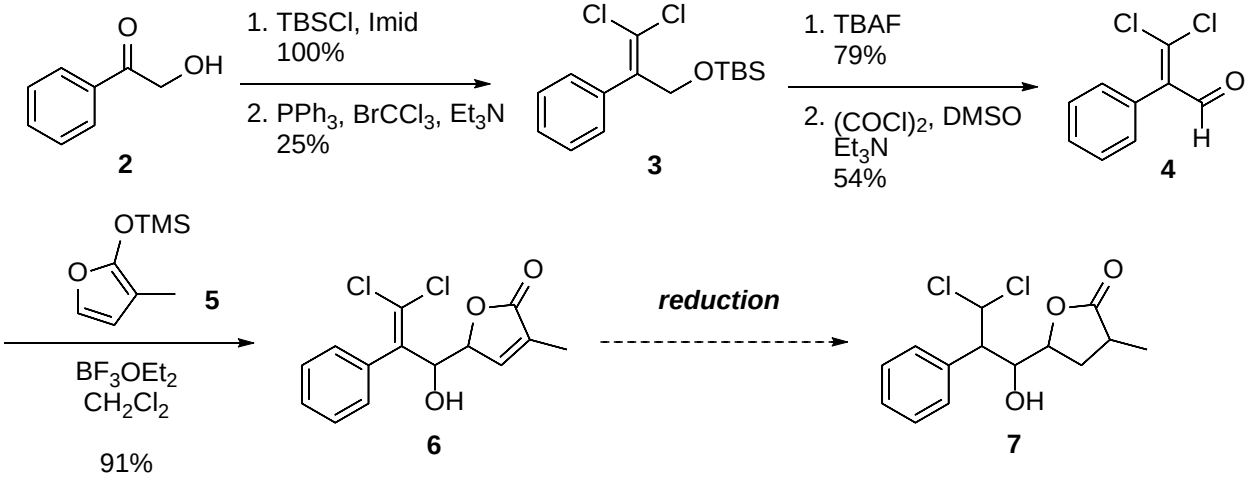
○堀江 智也[1]、深谷 圭介[1,2]、占部 大介[1,2] ([1]富山県大工、[2]富県大生医工研セ)
○TOMOYA HORIE[1], Keisuke Fukaya[1,2], Daisuke Urabe[1,2] ([1]Toyama pref. Univ., [2]Biotechnol, Res, Center, Toyama Pref. Univ.)

ナキテルピオシン(**1**)は海綿 *Terpious hoshinota* から単離された 6 環性化合物であり[1)]、マウス白血病細胞 P388 に細胞毒性を示すことが報告されている[2)]。**1**の構造上の特徴として、側鎖部上に特異なジクロロメチル基が存在する。本研究では側鎖部構築に向けたモデル研究を行った。



Nakiterpiosin (1)

アルコール **2** を出発物質とし、ヒドロキシ基を TBS 化した。その後、ケトンをジクロロビニルへと変換し、収率 25%で **3** とした。**3** に対して TBAF を用いた脱シリル化を行った後、Swern 酸化反応によりアルデヒド **4** を合成した。TMS エノラート **5** と **4** に対して、Lewis 酸存在下での付加反応を行い、**6** を 91%の収率で得た。今後は、**6** に対して還元を行い、モデル化合物 **7** の合成ルートを確立させる。



Nakiterpiosin (**1**) is a potent cytotoxic natural product and is expected as a new anti-cancer agent. Aiming at the total synthesis of **1**, the model study to establish the synthesis route of the side chain was carried out.

1) Teruya, T.; Nakagawa,S.; Koyama, T.; Arimoto, H.; Kita, M.; Uemura, D. *Tetrahedron*, **2004**, *60*, 6989.
2) Gao, S.; Wang, Q.; Huang, L, J.-S.; Lum, L.; Chen, C. *J. Am. Chem. Soc*. **2010**, *132*, 371.

Natural product Synthesis, Organic Chemistry, Nakiterpiosin

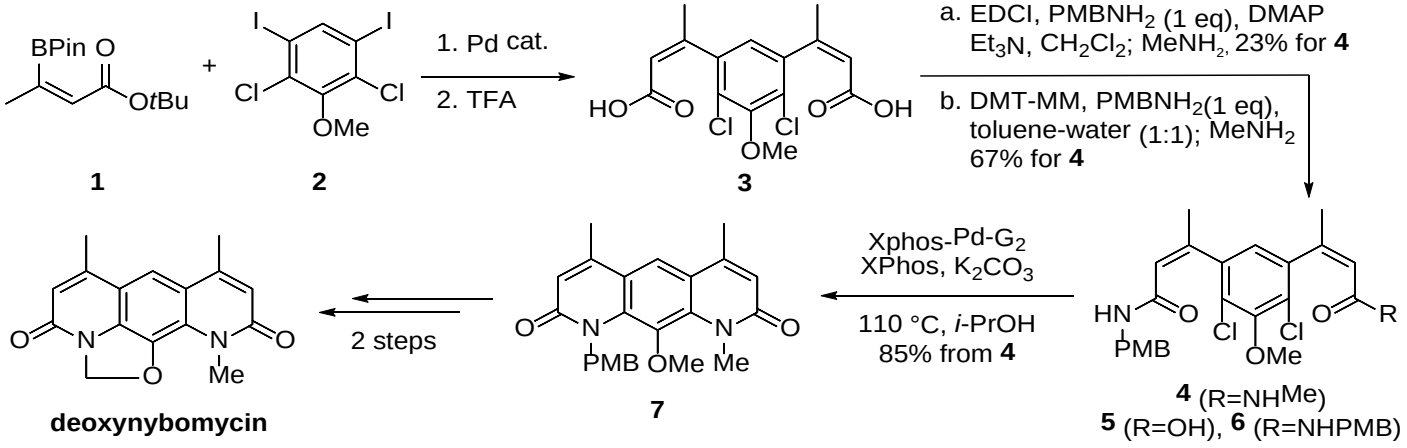
講演番号：3G01-13
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:00～ ミーティングルーム G

非対称アミド化を用いたデオキシナイボマイシンの合成

Synthetic study of deoxynybomycin by using the desymmetrizing amidation

○甲斐 瑛歩[1]、深谷 圭介[1,2]、濱田 昌弘[1,2]、馬場 理[3]、占部 大介[1,2]([1]富山県大工、[2]富県大生医工研セ、[3]順天堂大医)
○Akiho KAI[1], Keisuke FUKAYA[1,2], Masahiro HAMADA[1,2], Tadashi BABA[3], Daisuke URABE[1,2]
([1]Toyama Pref. Univ., [2]Biotechnol. Res. Center, Toyama Pref. Univ., [3]Juntendo Univ.)

デオキシナイボマイシンは *Streptomyces sp.*の放線菌培養物から単離されたフルオロキノロン系抗生物質である[1)]。薬剤耐性菌に特異な活性を示すことが報告されており、復帰抗生物質という新たな概念の薬剤として注目されている。我々は構造活性相関研究を指向して、既存の合成経路を改良したデオキシナイボマイシンの効率的合成を目指した。これまで報告されている合成の多くは、対称芳香環基質の非対称化を利用している[2),3),4),5)]。そこで本研究では、**1** 及び **2** のクロスカップリングにより合成したジカルボン酸 **3** の縮合反応における非対称化を新たに検討した。**3** に対して一般的な縮合条件(図中 a)で $PMBNH_2$ を作用させると確率論的に過剰縮合体 **6** が副生し、望みの非対称アミド **4** は 23%でしか得られなかった。そこで、ジカルボン酸 **3** と反応中間体であるモノカルボン酸 **5** の水溶性の差に着目し、水中でも縮合可能なトリアジン系縮合剤 DMT-MM[6)]による 2 層系での反応を設計した。この条件(図中 b)を用いると大幅な収率の向上に成功した。その後、Buchwald-Hartwig アミノ化により **7** とした後、2 工程でデオキシナイボマイシンを合成した。



Deoxynybomycin is a fluoroquinolone antibiotic isolated from *Streptomyces sp.* Herein, deoxynybomycin was synthesized in 10 steps by using the desymmetrizing amidation of dicarboxylic acid **3** as a key step.

1) Hergenrother, P. J. *et al.*, *Nat. Commun.*, **2015**, *6*, 6947. 2) Aragon, L. and Fuchter, M. J. *et al., Med. Chem. Commun.,* **2019**, *10*, 1438. 3) Rinehart, K. L. J. *et al., J. Am. Chem. Soc.,* **1970**, *92*, 6995. 4) Rinerhart, K. L. J. *et al., J. Am. Chem. Soc.,* **1973**, *95*, 5003. 4) Nussbaum. F. *et. al.*, **2009**, EP2130831A1. 5) Hergenrother. P. J. *et al., J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, *132*, 5469. 6) Kunishima. M. *et.al., Eur. J. Org. Chem.*, **2004**, 4535.

Natural Product Synthesis, Organic Chemistry, Antibiotics

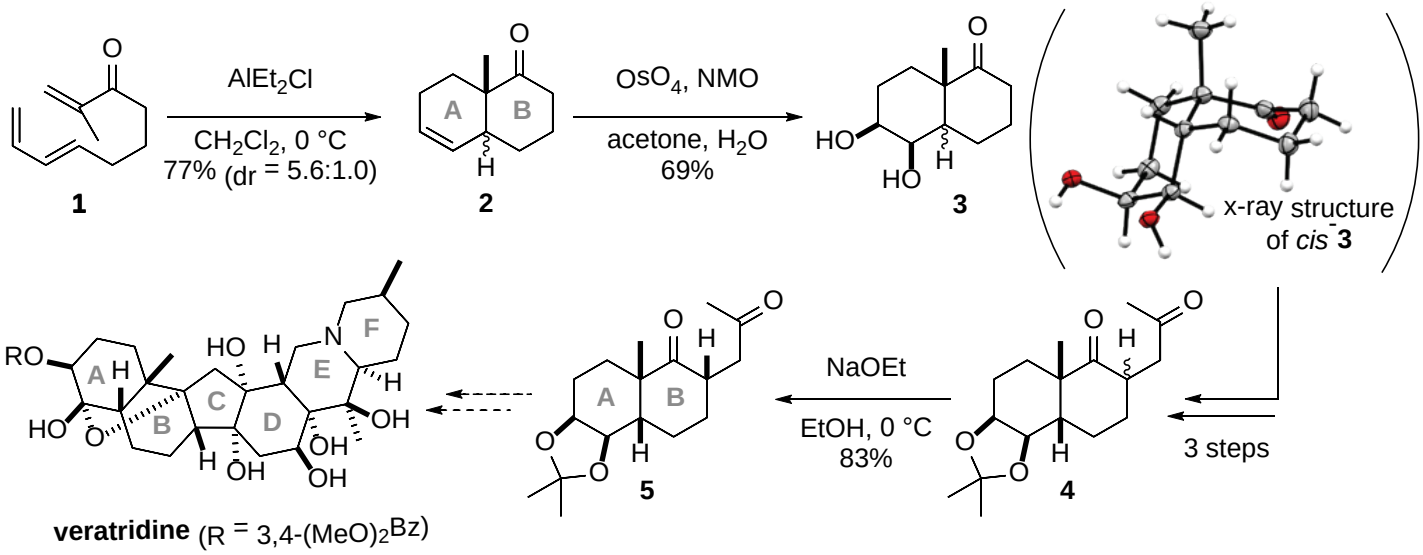
講演番号：3G01-14
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:00～ ミーティングルーム G

ベラトリジンの合成研究

Synthetic study of veratridine

○塩野 啓太[1]、深谷 圭介[1,2]、占部 大介[1,2] ([1]富山県大工、[2]富県大生医工研セ)
○Keita SHIONO[1], Keisuke FUKAYA[1,2], Daisuke URABE[1,2] ([1]Toyama Pref. Univ., [2]Biotechnol. Res. Center, Toyama Pref. Univ.)

ベラトリジンはユリ科植物から単離されたステロイドアルカロイドであり、電位依存性 Na^+チャネルを活性化し、神経伝達を阻害することが報告されている[1), 2)]。構造上の特徴として、高度に官能基化された 6 環性縮環骨格や特異な酸素架橋環が挙げられる。本研究ではベラトリジン AB 環部の構築を検討した。まず、1,5-ペンタンジオールより誘導したエノン **1** の分子内 Diels-Alder 反応でデカリン **2** を構築した。本反応では Lewis 酸に $AlEt_2Cl$ を用いることで、ジアステレオ比 5.6:1.0 で望みのシスデカリンが主生成物として得られた[3)]。次に **2** に対して convex 面より OsO_4 を作用させ、立体選択的にジオール **3** へと変換した。**3** を再結晶により精製した後、主生成物の構造を X 線結晶構造解析によって確認した。C 環部構築を指向して **3** からのアルキル基伸長を検討した結果、ジケトン **4** へと誘導した後エタノール溶媒中塩基を作用させると、単一ジアステレオマーで **5** が得られることが分かった。現在は **5** を用いて C 環及び酸素架橋環構築を検討している。



Veratridine is a steroid alkaloid that activates voltage-gated Na^+ channels and inhibits neurotransmission. In this research, diketone **5** was synthesized by the intramolecular Diels-Alder reaction of **1** and the following 5-steps stereoselective conversions.

1) Codding, P. W., *J. Am. Chem. Soc*., **1983**, *105*, 3172. 2) Catterall, W. A., *J. Biol. Chem*., **1975**, *250*, 4053. 3) Thamapipol, S.; Kündig, E. P., *Org. Biomol. Chem*., **2011**, *9*, 7564.

Natural Product synthesis, Organic Chemistry, Steroidal Alkaloid

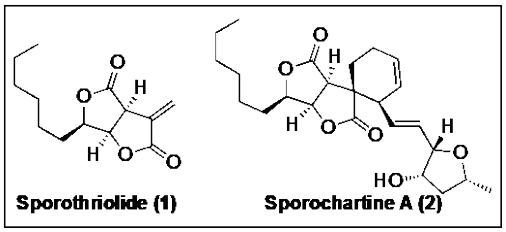
講演番号:3G01-15
質疑応答日時、会場:3 月 20 日 09:00～ ミーティングルーム G

(−)-Sporothriolide の全合成

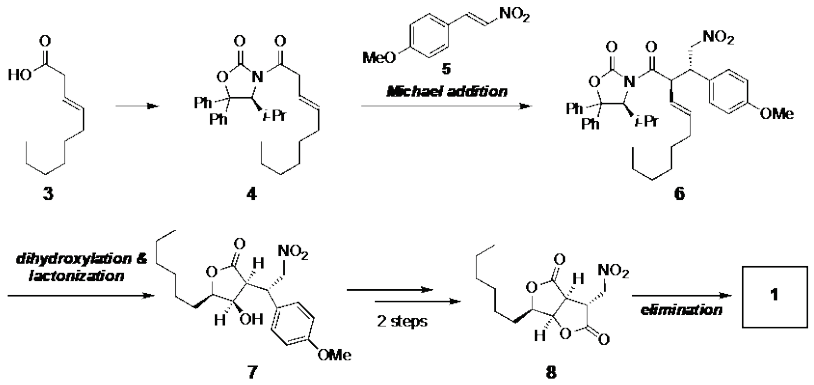
Total synthesis of (−)-Sporothriolide

〇木村 光来、毛利 朋世、佐藤 俊太郎、桑原 重文（東北大院農）
〇MIKU KIMURA, TOMOYO MOHRI, SYUNTARO SATO, SHIGEFUMI KUWAHARA (Tohoku Univ.)

【目的】(−)-Sporothriolide (**1**)は、真菌 *Sporothrix* sp. (strain No. 700)より単離・構造決定された化合物であり、抗糸状菌活性や除草活性を有する [1]。また **2** のように **1** から生合成されていると考えられる天然物も報告されている。我々は、**1** の詳細な生理作用や **2** の生合成経路等の解明には、全合成による標品供給が不可欠と考え、まず短工程かつ簡便な **1** の全合成経路の確立を目指して研究を開始した。



【方法・結果】まず既知のカルボン酸 **3** より導いた **4** をニトロオレフィン **5** との不斉マイケル付加反応に付すことで **6** へと導いた。**6** に対する不斉ジヒドロキシ化と分子内環化は一挙に進行することを見出し、効率良く **7** を得ることに成功した。続く芳香環の酸化的開裂とラクトン環形成によって **8** とした後、**8** の塩基処理によるニトロ基の脱離を経て **1** の短工程全合成を達成した。既知のカルボン酸 **3** より総工程数 7 工程、総収率 18%にて全合成を達成した。



1) B. Schulz *et al.*, *J. Antibiot.* **1994**, *47*, 113-118.

(−)-Sporothriolide (**1**), which is incorporated in the known natural product sporochartine A (**2**), was isolated from *Sporothrix* sp. (strain No. 700) as an antibacterial and herbicidal substance. Herein, we report on our efficient asymmetric total synthesis of **1**.

Our synthesis commenced with the asymmetric Michael addition of **4** to nitro olefin **5** to give **6** as a single diastereomer. Dihydroxylation of **6** and subsequent lactonization of the resulting diol provided **7**. The formation of an additional lactone ring was achieved via Ru-catalized oxidative cleavage of the benzene ring of **7**. Introduction of the *exo*-methylene group by elimination of the nitro group in basic conditions completed the concise total synthesis of (−)-**1** in 7 steps from known carboxylic acid **3**.

total synthesis, natural product, bioactive compound

発表責任者:木村光来（miku.kimura.r8@dc.tohoku.ac.jp）

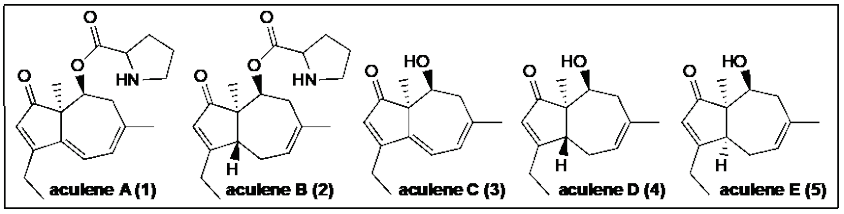
講演番号：3G01-16
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:00～ ミーティングルーム G

Quorumsensing 阻害物質 aculene D の全合成

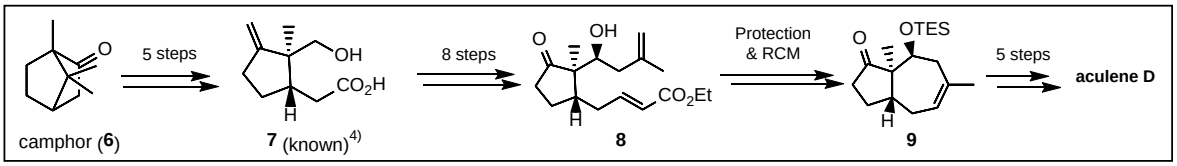
Total synthesis of aculene D, a norsesquiterpene showing quorum sensing inhibitory activity

○横川 陽向[1]、石澤 誠也[2]、齋藤 克哉[1]、桑原 重文[1]、榎本 賢[1] ([1]東北大学院農、[2]東北大学農)
○Hinata Yokokawa[1], Seiya Ishizawa[2], Katsuya Saito[1], Shigehumi Kuwahara[1], Masaru Enomoto[1] ([1]Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University, [2]Faculty of Agriculture, Tohoku UniversityFaculty of Agriculture, Tohoku University)

【背景･目的】Aculene 類は，*Aspergillus* 属および *Penicillium* 属の真菌から単離・構造決定された新規化合物群であり[1-3]，**3–5** については *Chromobaterium violaceum* CV026 に対して quorum sensing (QS) 阻害活性を示すことが報告されている[3]。QS 阻害物質は新規抗菌剤のリード化合物として着目されていることから，我々は構造活性相関研究への展開も視野に入れ，aculene 類の網羅的合成を目指して本研究に着手した。



【方法・結果】(±)-Camphor (**6**) を出発原料として既知の方法に従ってカルボン酸 **7** へと導いた[4]。その後，キレーションを利用した立体選択的な methallyl 化を含む 8 工程の変換により **8** を得た。続いて，閉環メタセシス(RCM)による 7 員環の構築を試みたところ，**8** に対する RCM は進行しなかったが，**8** のヒドロキシ基を保護した化合物では望みの反応が進行し，共通中間体である **9** の合成を完了した。その後 5 工程の変換を行い，aculene D (**4**)の初の全合成を達成した。今後は，**9** からその他の aculene 類の網羅的全合成を達成する予定である。



1) T. O. Larsen, *et al. Molecules*, **2014**, *19*, 10898. 2) J.-M. Gao, *et al. Molecules*, **2015**, *20*, 325. 3) Y. X. Zhao, *et al. Arch. Pharm. Res.* **2017**, *40*, 25. 4) H. Hutchinson, *et al. Can. J. Chem.* **1986**, *64*, 854.

Aculenes are norsesquiterpenes first isolated from the culture broth of *Aspergillus* sp. and later from *Penicillium* sp.[1–3] Although no biological activity for aculenes A (**1**) and B (**2**) has been reported to date, aculenes C–E (**3**–**5**) have exhibited QS inhibitory activity against *Chromobacterium violaceum* CV026.[3] Since QS inhibitors control the production of virulence factors, they are being investigated as promising lead compounds for therapeutic agents. In this general lecture, we report the first total synthesis of (±)-**4**.

Our synthesis of **4** began with the conversion of **7**, which was prepared from (±)-camphor (**6**) according to a known procedure,[4] into ester **8** by an eight-step sequence including stereo-selective introduction of a methallyl group. Although ring-closing metathesis (RCM) of **8** was unsuccessful, its TES ether was successfully cyclized via RCM to afford **9**. A subsequent five-step sequence involving oxidation of **9** to the corresponding enone followed by installation of an ethyl group completed the first total synthesis of (±)-**4**. Optimization of the reaction conditions as well as synthetic efforts toward other aculenes are in progress.

total synthesis, quorum sensing, aculenes

講演番号：3G03-01
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:00～ ミーティングルーム G

奇数鎖脂肪酸は分裂酵母において細胞膜極性と細胞分裂に異常を引き起こす

Odd-chain fatty acids perturb plasma membrane polarity and cell division in fission yeast

○星川 陽次郎[1]、西村 慎一[1,2]、松山 晃久[1,3]、Li Sheena[4]、八代田 陽子[3,4]、Boone Charles[4]、吉田 稔[1,2,3,5] ([1]東大院農・応生工、[2]東大・微生物連携機構、[3]理研 CSRS・ケミカルゲノミクス、[4]理研 CSRS・分子リガンド標的、[5]理研 CSRS・創薬シード)
○ Yojiro HOSHIKAWA[1], Shinichi Nishimura[1,2], Akihisa Matsuyama[1,3], Sheena Li[4], Yoko Yashiroda[3,4], Charles Boone[4], Minoru Yoshida[1,2,3,5] ([1]Dept. Biotechnol., Univ. Tokyo, [2]CRIIM, UTokyo, [3]Chem. Genomics Res. Gr., RIKEN CSRS, [4]Mol. Ligand Target Res. Team, RIKEN CSRS, [5]Drug Discov. Seed Cpd. Exploratory Unit, RIKEN CSRS)

生体に含まれる脂肪酸の炭素鎖長はほとんどが偶数であり、奇数鎖脂肪酸は微量にしか存在しない。奇数鎖脂肪酸についてその生合成経路は報告されているものの、生理機能は依然として不明である。我々は最近、奇数鎖脂肪酸が分裂酵母の生育を顕著に阻害する一方、エルゴステロールの生合成遺伝子変異株に対しては生物活性を示さないことを見出した。この思いがけない現象を分子レベルで理解することにより、炭素鎖長が制御する脂肪酸の新しい機能を解明できると期待できる。そこで本研究では、奇数鎖脂肪酸による分裂酵母の生育抑制メカニズムの解析を行った。

まず、炭素数 15 の脂肪酸（FA-C15）で処理した細胞の形態解析を行った。細胞分裂中に形成する隔壁を蛍光染色して観察したところ、FA-C15 は隔壁形成異常を引き起こすことを見出した。詳細な解析により、この異常は細胞質分裂を制御する Mid1 の局在不全により生じる可能性が示唆された。このとき核を観察してみると、FA-C15 処理による核の分配不全が認められた。さらに、細胞膜ステロールの局在を解析したところ、細胞端への局在が FA-C15 処理により解消されることが分かった。次に、FA-C15 作用機序に関与する遺伝子をゲノムワイドに探索した結果、細胞質分裂に重要なタンパク質をコードする *mid2* 遺伝子を見出した。*mid2* 遺伝子破壊株では FA-C15 感受性が低下するとともに FA-C15 による細胞形態異常が抑制された。本発表では奇数鎖脂肪酸が分裂酵母に引き起こす細胞形態異常とそのメカニズムに関する最新の結果を報告する。

Fatty acids in organisms usually have even-numbered carbons; however, odd-chain fatty acids (OCFAs) also exist in minute amounts. Although the biosynthetic pathway of OCFAs was identified, their functions remain unknown. We have recently found that odd-chain fatty acids (OCFAs) inhibit the growth of fission yeast wild-type cells, but not ergosterol biosynthetic mutant cells. To understand the functions of OCFAs, we started analyses of the molecular mechanisms underlying the toxicity of OCFAs to fission yeast.

We first analyzed the cell morphology of fission yeast cells treated with pentadecanoic acid (FA-C15). Fluorescent labeling of the septum revealed that septum formation was perturbed by FA-C15. Further microscopic analyses suggested that the septation defect was likely caused by mis-localization of Mid1, a key protein for cytokinesis. Moreover, we found that FA-C15 induces defective nuclear division. We also observed the distribution of membrane sterol using a specific fluorescent probe to find that FA-C15 treatment diminished polarized distribution of sterols at the cell tips. Besides morphological analyses, we screened for genes whose deletion alters the sensitivity to FA-C15 using a gene deletion mutant library. Among the genes identified, we focused on *mid2* whose product functions during cytokinesis. *mid2*Δ cells were less sensitive to FA-C15 and recovered from the cytokinesis defects induced by FA-C15. In this presentation, we will report our latest findings on the morphological defects caused by OCFAs and discuss about the molecular mechanisms.

fission yeast, lipid, cell division

発表責任者：星川陽次郎（yhoshikawa@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3G03-02
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:00～ ミーティングルーム G

蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET)を用いたアミロイドβタンパクのプロトフィブリル形成の検出

DETECTION OF PROTOFIBRIL FORMATION OF AMYLOID ß-PROTEIN USING FÖRESTER RESONANCE ENERGY TRANSFER (FRET)

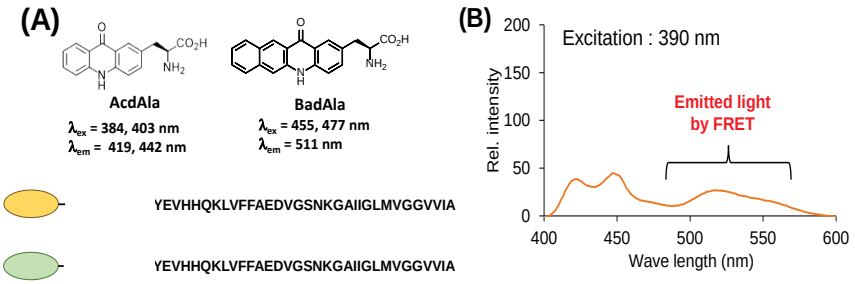
○杉山 恵里、稲垣 穣、増田 裕一 (三重大生物資源)
○Eri SUGIYAMA, Minoru INAGAKI, Yuichi MASUDA (Mie Univ.)

アルツハイマー病の原因物質である 42 残基のアミロイドβタンパク(Aβ42)は、凝集して神経細胞毒性を示すことから、Aβ42 の凝集を簡便に検出する方法が望まれている。我々はこれまで、Aβ42 の N 末端に蛍光アミノ酸の Acridonylalanine (AcdAla)および Benzoacridonylalanine (BadAla)をそれぞれ導入した 2 種類の蛍光標識 Aβ42 (Acd-Aβ42 および Bad-Aβ42)を合成した(図 A)[1)]。2 種類の Aβ42 の等量混合物を凝集させると、2 種類の蛍光基の接近により起こる FRET が観測されたことから、凝集量の指標として使えることが示唆された。

Aβ42 の凝集中間体であるプロトフィブリルは、凝集体(フィブリル)よりも神経細胞毒性が高い。そこで、Acd-Aβ42 と Bad-Aβ42 を用いて、プロトフィブリル形成を FRET としての観測出来るかどうか検証した。2 種類の Aβ42 の等量混合物 (Acd-Aβ42 12.5 µM + Bad-Aβ42 12.5 µM)を PBS 中、37°C で 2 時間インキュベーションした後、ゲルろ過カラムを用いてプロトフィブリルを分取した。得られたプロトフィブリルに 390 nm の励起光を照射すると、AcdAla からの FRET を介した BadAla の蛍光が観測された(図 B)。

We previously synthesized fluorescence labeled Aβ42 peptides bearing acridonylalanine (AcdAla) and benzoacridonylalanine (BadAla) at the N-terminus (Fig. A)[1)]. When an equal mixture of the two fluorescent labeled Aβ42 was aggregated, we observed FRET from Acd-Aβ42 to Bad-Aβ42, which could be used for detection of the Aβ42 aggregation.

It has reported that Aβ42 protofibrils, a kind of aggregation intermediate, cause stronger neurotoxicity than the fibrils. Here, we obtained protofibril of an equal mixture of Acd-Aβ42 and Bad-Aβ42 using size exclusion chromatography, and investigated the FRET detection of the protofibrils. Fluorescence emission spectra of the protofibril of the two fluorescent labeled Aβ42 were recorded using 390 nm excitation. We observed the emission of BadAla via the intermolecular FRET from excited AcdAla (Fig. B)



【引用文献】1)杉山恵里, 日本農芸化学会 2020 年度大会講演要旨集, 3B03p14.

Alzheimer's disease, Amyloid β-protein, FRET

発表責任者：増田 裕一（masuda@bio.mie-u.ac.jp）

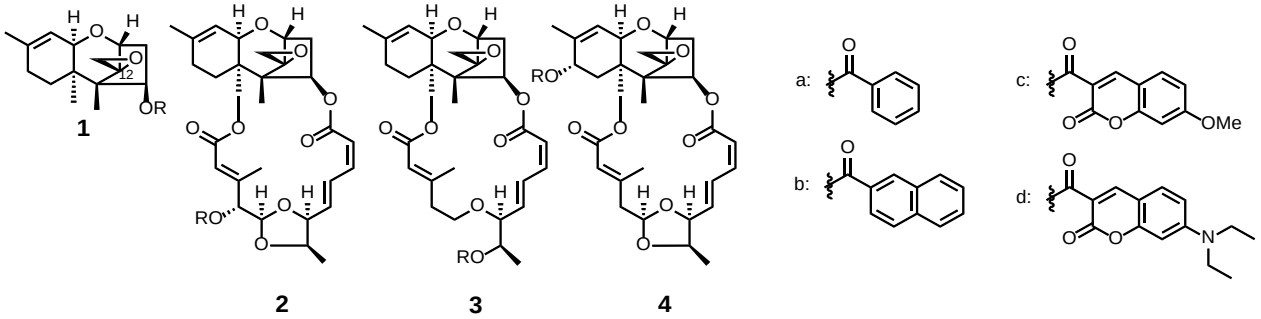
講演番号：3G03-03
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:00～ ミーティングルーム G

マクロリド環を有する tricothecene 類の構造活性相関研究

Structure-Activity Relationship Study of Tricothecenes with Macrolide Rings

○岡村 毅、前多 隼人、森田 英嗣、石田 幸太郎、橋本 勝（弘前大農）
○ Takeshi OKAMURA, HAYATO MAEDA, EIJI MORITA, KOUTARO ISHIDA, MASARU HASHIMOTO (Hirosaki Univ)

強力なカビ毒である trichothecene 類の毒性は 12 位 epoxide に起因すると考えられてきた。我々は、単純型 trichothecene では毒性が著しく減少するが、マクロリド構造を有する roridin 類では epoxide がなくても、毒性が維持されることを明らかにし昨年の本大会で発表した。本研究では trichothecene 類が作用する部位を特定すべく、ヒト結腸癌 Colo201 及びヒト子宮頸癌 Hela 細胞を用いて実験を行った。まず、trichodermol (**1**) , roridin J (**2**), epiisororidin E (**3**) 及び roridin H (**4**) (R = H)を、benzoyl 化（→**1a**, **2a**, **3a**, **4a**）及び naphthoyl 化（→**1b**, **2b**, **3b**, **4b**）したところ、単純型 **1a**, **1b** の細胞毒性は低下したが、マクロリドを有する **2**, **3** 及び **4** のエステル誘導体では毒性がほぼ維持された。そこで、構造変化を最小にすることを考慮して coumarin を導入した **1c**–**4c** を調製した。予想通り、、マクロリドを有する **2c**-**4c** では毒性が維持され、蛍光顕微鏡観察では細胞質に輝点として検出された。さらに、励起波長を使用する蛍光顕微鏡の特性に合わせた **1d** および **3d** を調製し、これらの細胞毒性、蛍光顕微鏡観察の結果について発表する。



We have revealed that the C-12 epoxide of trichothecene is not necessary for the cytotoxicity if those carry a macrolide ring (so called roridins). In this study we prepared derivatives carrying benzoate, naphthoate, and coumarate. We also prepared analogs with fluorophore. As expected, ester derivatives from **2**, **3** and **4** showed potent cytotoxicity against Hela S3 and Colo201 cells, while the derivatives from **1** showed faint toxicity. The cytotoxicity of these derivatives as well as the fluorescence microscopic analysis will be presented in our talk.

Cytotoxicity, Trichothecenes, Fluorescence observation

発表責任者：橋本勝（hmasaru@hirosaki-u.ac.jp）

講演番号：3G03-04
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:00～ ミーティングルーム G

光屈性制御物質を用いたダイコン光屈性メカニズムの生物有機化学的研究

Bioorganic chemical study　on the mechanism of radish-phototropism　using tropism-regulating substance

○野口 美輝[1]、渡邉 諒子[1]、渡邉 秀典[2]、山田 小須弥[3]、繁森 英幸[3,4] ([1]筑波大院生命環境、[2]東京大院農学生命、[3]筑波大生命環境系、[4]筑波大 MiCS)
○Yoshiki NOGUCHI[1], Ryoko WATANABE[1], Hidenori WATANABE[2], Kosumi YAMADA[3], Hideyuki SHIGEMORI[3,4] ([1]Grad. Sch. Life & Environ. Sci., Tsukuba Univ., [2]Grad. Sch. Agr. Life. Sci., Tokyo Univ., [3]Fac. Life Environ Sci., Tsukuba Univ., [4]MiCS, Tsukuba Univ.)

植物の光屈性現象のメカニズムは、古くから Cholodny-Went 説で説明されてきた。しかしながら近年、光側組織で生成する成長抑制物質 （光屈性制御物質）が屈曲の引き金であるとする Bruinsma-Hasegawa 説も提唱されている。そこで本研究では、ダイコン芽生えの光屈性制御物質である MTBI および Raphanusanin の構造活性相関を調べることで成長抑制に重要な構造部位を解明することを目的とする。市販の Thiolane を出発原料として MTBI および Raphanusanin の全合成を行い、中間体も含めて種々の関連化合物を得た。各化合物について屈曲誘導活性、抗オーキシン活性、細胞壁の剛直化誘導活性を調べた。その結果、MTBI による屈曲誘導にはイソチオシアネート構造が重要であり、細胞壁の剛直化により成長抑制が引き起こされていると示唆された。一方で、Raphanusanin による屈曲誘導にはメチルチオエノレート構造のメチル基および二重結合は重要でなく、本化合物の抗オーキシン活性により成長抑制を引き起こしていると示唆された。また、Raphanusanin による屈曲角度は投与後 90 分で最大になることから、光屈性制御物質は光屈性の初期段階において屈曲応答の引き金として作用している可能性が強く示唆された。

The mechanism of phototropism has long been explained by Cholodny-Went theory. Recently, Bruinsma-Hasegawa theory has been proposed in which a phototropism-regulating substance produced in the illuminated-side is the trigger of bending. Therefore, the purpose of this study is to investigate the structure-activity relationship of MTBI and raphanusanin, which are phototropism-regulating substances from radish seedlings. MTBI, raphanusanin, and related compounds were synthesized using thiolane as a starting material. The bending inducing ability, anti-auxin activity, and cell wall stiffness induction of each compound were evaluated. The results suggested that the isothiocyanate moiety is important for the induction of bending by MTBI, and that growth suppression was caused by the stiffening of the cell wall. It was suggested that the methyl group and the double bond of methylthioenolate moiety were not important for the induction of bending by raphanusanin. Since the bending angle by raphanusanin reached its maximum at 90 min. after administration, these phototropism-regulating substances act as trigger for the bending response in the initial stage of phototropism.

Bruinsma-Hasegawa theory, phototropism-regulating substance, raphanusanin

講演番号：3G03-05
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:00～ ミーティングルーム G

フキ属山菜の化学系統分類規定成分 bakkenolide 類による interleukin-2 産生阻害作用
Inhibitory effects of bakkenolides identified from *Petasites japonicus* on interleukin-2 production

○上杉 祥太[1]、箱崎 真友佳[1]、菅野 裕子[1]、高橋 穂乃香[2]、工藤 唯[2]、木村 賢一[2]、山田 秀俊[3]、矢野 明[1] ([1]岩手生工研、[2]岩手大院・総合科学、[3]帝京科学大・生命環境)
○Shota UESUGI[1], Mayuka HAKOZAKI[1], Yuko KANNO[1], Honoka TAKAHASHI[2], Yui KUDO[2], Ken-ichi KIMURA[2], Hidetoshi YAMADA[3], Akira YANO[1] ([1]IBRC, [2]Grad. Sch. of Arts and Sci., Iwate Univ., [3]Dep. of Life & Health Sci., Teikyo Univ. of Sci.)

【背景・目的】フキ・フキノトウ（*Petasites japonicus*）は、春を告げる山菜として親しまれている。本植物には、主たるテルペノイドの種類が異なる“化学系統分類”が存在し、それを規定する化合物として fukinone、petasin、bakkenolide B が知られる。このうち fukinone を含む“愛知早生フキ”は、抗アレルギー素材として応用されている。今回、fukinone を含まないタイプのフキノトウに酵母 Ca^{2+}シグナル伝達阻害作用を見出したため、活性物質の同定とヒト細胞株における作用の検証を行った。
【方法・結果】Ca^{2+}シグナル伝達に関与する遺伝子変異酵母 YNS17 株（*zds1*Δ *erg3*Δ *pdr1/3*Δ）の生育回復活性を示すものとしてフキノトウを見出し、活性物質を 85.5 mg 単離した。質量分析で示された分子式 $C_{22}H_{30}O_6$ に基づき、フキノトウに含まれる bakkenolide B の市販標品と HPLC 保持時間、MS/MS スペクトル、^{1}H NMR 等を比較し、活性物質を bakkenolide B（**1**）と同定した。**1** は、YNS17 株に Ca^{2+} 依存的な生育回復活性を示した。また、**1** は酵母に Li^+感受性を惹起し、Ca^{2+}シグナルのうち calcineurin 経路を阻害すると示唆された。そこで、ヒト T 細胞株 Jurkat を用い、calcineurin 経路で発現調節される interleukin-2（IL-2）への影響を解析した。PMA+ionomycin 刺激で促進される IL-2 のタンパク質産生は、**1** により抑制された（ELISA, IC_{50} = 6.3 μM）。また、2 か所のエステル側鎖を欠いた bakkenolide A は IL-2 産生抑制作用が **1** より弱い（IC_{50} = 24.6 μM）ことから、これらの部分構造が活性に重要であると考えられた。IL-2 は、アトピー性皮膚炎等の促進に働くサイトカインであり、bakkenolide B を主成分とするタイプのフキノトウはこのような病態に対して有用である可能性が期待される。

【Purpose】 *Petasites japonicus* is classified based on the composition of main terpenoids. This is called “chemotaxonomy”. Fukinone, petasin, bakkenolide B have been reported as terpenoids which characterize the chemotaxonomy. In this study, we demonstrated identification and functional analysis of a Ca^{2+}-signaling inhibitor isolated from *Petasites japonicus*. **【Results and Discussion】** We isolated a Ca^{2+}-signaling inhibitor (85.5 mg) using yeast-based assay (YNS17 strain: *zds1*Δ *erg3*Δ *pdr1/3*Δ). This compound was identified as bakkenolide B (**1**) by comparing of HPLC, MS/MS spectrum and ^{1}H NMR with commercial standard. **1** showed Ca^{2+}-dependent growth-restoring activity in YNS17 strain. Since it caused Li^+ sensitivity, we assessed the effects of **1** against calcineurin pathway. **1** inhibited the production of interleukin-2 (IL-2) (IC_{50} = 6.3 μM) in Jurkat cells. Additionally, this effect of bakkenolide A, an analog of **1** lacking two ester moieties, was weaker than **1** (IC_{50} = 24.6 μM). It indicated that these moieties are important for the effect of **1** against IL-2 production.

Petasites japonicus, interleukin-2, chemotaxonomy

発表責任者：上杉祥太（s-uesugi@ibrc.or.jp）

講演番号：3G03-06
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:00～ ミーティングルーム G

人工キノン類を用いた複合体-I のキノン結合ポケットの構造特性の解明

Exploring the quinone-binding pocket in mitochondrial respiratory complex I using synthetic quinones as molecular probes

○宇野 晋平[1]、桝谷 貴洋[1]、伊藤（新澤） 恭子[2]、志波 智生[3]、稲岡 健ダニエル[4]、村井 正俊[1]、三芳 秀人[1] ([1]京大農、[2]兵庫県立大生命理学、[3]京都工芸繊維大工芸科学、[4]長崎大熱帯医学)

○Shinpei Uno[1], Takahiro Masuya[1], Kyoko Itoh-Shinzawa[2], Tomoo Shiba[3], Daniel Ken Inaoka[4], Masatoshi Murai[1], Hideto Miyoshi[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Univ. of Hyogo, [3]Kyoto Institute of Technology, [4]Nagasaki Univ.)

【背景・目的】ミトコンドリア呼吸鎖電子伝達系の初発酵素である NADH-キノン酸化還元酵素（複合体-I）は、基質の酸化還元と共役したプロトン輸送を行う膜タンパク質複合体である。X 線結晶構造やクライオ EM 構造を参照すると、キノン結合ポケットは入口の内径が約 4～5Å、奥行きが約 30Åの狭く長い**“チャンネル”**様の構造をとっている。キノンはチャンネル最深部に位置する鉄-硫黄クラスターに接近して電子を受容し、“後退り”して出て行くと考えられているが、これは実験的に証明されたわけではない。本研究では、系統的に合成した**“嵩高い”**キノン類（oversized ubiquinones, OS-UQ 類）を化学ツールとすることで、キノン結合ポケットの構造特性を検証することを目的とした。

【結果】嵩高いブロック（～13 Å）を持つ OS-UQ 類（OS-UQ1～OS-UQ5, **図 1(A)**）を合成し、ウシ心筋亜ミトコンドリア粒子における電子受容活性を測定したところ、OS-UQ 類は天然のキノン類縁体と同等の活性を示した。スペーサー長の一番短い OS-UQ1 では、他の類縁体と比較して、電子受容活性に対するプロトン輸送活性が有意に低下した。これらの結果は「**キノン結合ポケットはダイナミックに構造変化し、多様なリガンド分子を収容できる**」ことを示唆している。

これと並行して、単離精製したウシ複合体-I とトリパノソーマ由来のキノール酸化酵素をプロテオリポソームに再構成し、OS-UQ 類（OS-UQ6～OS-UQ8, **図 1(B)**）の電子受容活性を評価したところ、チャンネルの奥行きよりも長い側鎖を持つ OS-UQ8 のみが電子受容活性を示した。現段階では、この一見矛盾する結果を十分に説明できないが、精製された複合体-I とミトコンドリア膜に内在する複合体-I との間の何らかの構造的な差異を反映しているのかもしれない。

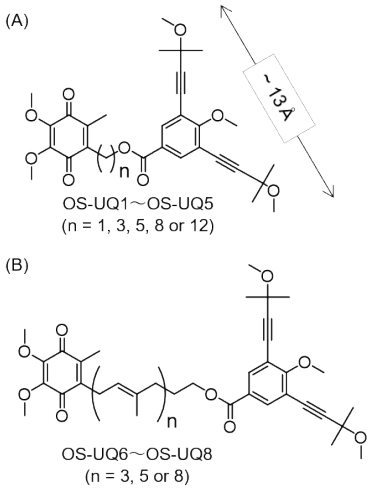


図 1. OS-UQ 類の構造

The architecture of quinone-access channel in proton-translocating NADH-quinone oxidoreductase (respiratory complex I) was modeled by X-ray crystallography and cryo-EM. However, it remains debatable whether the channel model reflects the physiologically relevant state present throughout the catalytic cycle. We investigated whether bovine complex I can catalytically reduce a series of oversized ubiquinones (OS-UQs), which are highly unlikely to transit the narrow channel due to a bulky “block” (~13 Å across). We found some OS-UQs function as efficient electron acceptors from complex I in submitochondrial particles (SMPs), being comparable with natural ubiquinones. Notably, the proton translocating efficiencies of OS-UQs significantly varied depending on their side chain structures. These results are difficult to reconcile with the current channel model. Nevertheless, contrary to the observations in SMPs, OS-UQs were not catalytically reduced by isolated complex I reconstituted into liposomes.

respiratory complex I, ubiquinone, mitochondria

講演番号：3G03-07
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:00～ ミーティングルーム G

呼吸鎖複合体-I ユビキノン結合部位の構造解明に向けたサブユニット間クロスリンク
Site-specific chemical cross-linking for elucidating the ubiquinone reaction site in mitochondrial complex I

○桝谷 貴洋、宇野 晋平、村井 正俊、三芳 秀人（京大院農）
○Takahiro Masuya, Shinpei Uno, Masatoshi Murai, Hideto Miyoshi (Kyoto Univ.)

【目的】ミトコンドリア電子伝達系の呼吸鎖複合体-I は、基質の酸化還元を行う親水性ドメインとプロトン輸送を行う膜ドメインからなり、両ドメインの境界領域におけるユビキノン還元反応は、２つ反応の共役において鍵となる。X 線結晶構造や cryo-EM 構造から、ユビキノン反応部位は入口内径約 6Å、奥行き約 30Åの細長い“トンネル様”の構造をとっているというモデルが提唱されている（トンネルモデル、図１）。しかし、これまで当研究室で実施して来た生物有機化学を基盤とする諸々の実験結果は、ユビキノン反応部位はトンネルモデルで説明できるほど単純なものではないことを示唆する。本研究では、ユビキノン反応部位の構造情報に関するさらなる知見を得るため、トンネルモデルではユビキノン反応部位の外側に位置する ND3 サブユニットの Cys39（ND3-Cys39）と、ユビキノン反応部位の最深部に位置する 49 kDa サブユニットの Asp160（49 kDa-Asp160、図１）に注目し、両残基が 2 残基反応性クロスリンカーで直接的にクロスリンクできるか調べた。

【結果】我々はタンパク質化学修飾法の１つであるトシル化学に着目して、49 kDa-Asp160 に対して特異的にシクロプロペンを導入する方法論を確立している。そこで、シクロプロペンと水中で速やかに環化付加反応（逆電子要請型 Diels-Alder 反応）するテトラジンと、システインの SH 基と反応するマレイミドを有する 2 残基反応性クロスリンカーを合成した。トシル化学によって 49 kDa-Asp160 にシクロプロペンを導入した複合体-I を事前に調製しておき、これに対して 2 残基反応性クロスリンカーを供した後、両サブユニットがクロスリンクするかどうかを調べた。その結果、両サブユニットが特異的にクロスリンクすることがわかった。この結果は、ユビキノン反応部位の構造は cryo-EM 構造から提唱されているような狭いトンネル様の構造ではなく、多様なリガンド分子を収容できるほど柔軟性を持つことを意味している。

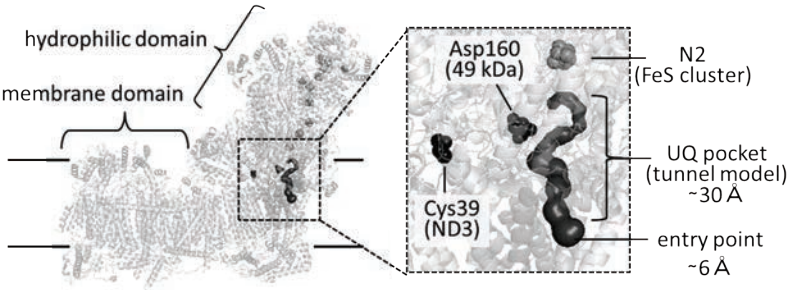


図 1. 複合体-I の構造とトンネルモデル.

To elucidate dynamics of the ubiquinone reaction site in mitochondrial complex I, we examined whether Cys^{39} of ND3 and Asp^{160} of 49-kDa can be cross-linked by bifunctional cross-linkers. Based on the structural models of complex I, such cross-linking is inconceivable because ND3-Cys^{39} and 49-kDa-Asp^{160} are separated by peptide chains forming the channel wall. However, three bifunctional cross-linkers did cross-link ND3-Cys^{39} and 49-kDa-Asp^{160}. This result indicates that the quinone reaction cavity is accessible from the matrix-side region covered by the first loop in ND3.

mitochondrial complex I, chemical biology, bioenergetics

発表責任者：桝谷貴洋（masuya.takahiro.5e@kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3G03-08
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:00～ ミーティングルーム G

コレラ菌 Na^+輸送型 NADH-キノン酸化還元酵素の NqrB サブユニットの位置特異的化学修飾

Pinpoint chemical labeling of the NqrB subunit in Vibrio cholerae Na^+-pumping NADH-quinone oxidoreductase

○石川 萌[1]、田中 比奈子[1]、桝谷 貴洋[1]、バルケラ ブランカ[2]、村井 正俊[1]、三芳 秀人[1]([1]京都大農、[2]レンセラー工科大)

○Moe ISHIKAWA[1], Hinako TANAKA[1], Takahiro MASUYA[1], Blanca BARQUERA[2], Masatoshi MURAI[1], Hideto MIYOSHI[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Rensselaer Polytechnic Institute)

【背景・目的】Na^+輸送型 NADH-キノン酸化還元酵素（Na^+-NQR）は、基質の酸化還元と共役したNa^+の能動輸送を行う膜タンパク質複合体であり、コレラ菌や緑膿菌などの病原性細菌に必須のエネルギー代謝酵素である。コレラ菌 Na^+-NQR の X 線結晶構造を参照すると、酵素のターンオーバーに伴ってキノン結合部位付近で大きな構造変化が生じることが予想されるが、未だに実証されていない。本研究では、いわゆる 1 分子解析などの生物物理学的手法によって Na^+-NQR の構造変化を捉えることを将来的な目標に見据え、酵素の鍵領域であるキノンや阻害剤の結合部位近傍のアミノ酸残基を、機能性分子よって位置特異的に化学修飾する方法論の確立を目指した。

【方法・結果】Na^+-NQR の位置特異的化学修飾の手段として、ligand directed *N*-acyl-*N*-alkyl sulfonamide chemistry に着目し、リガンド分子を設計した（NK1 および NK2、**図 1**）。Na^+-NQR の特異的阻害剤の一つであるコロルミシンを鋳型とし、1 次タグ分子としてクリックケミストリーの足場となる末端アルキンを採用した。これらのリガンド分子を用いて、コレラ菌 Na^+-NQR の化学修飾を試みたところ、本酵素を構成する 6 つのサブユニットのうち、キノンや阻害剤の結合に強く関与する NqrB サブユニットの N 末端領域のリシン残基が特異的に修飾されることがわかった。現在、精密質量分析と部位特異的アミノ酸変異を駆使して、アミノ酸残基の同定を進めている。

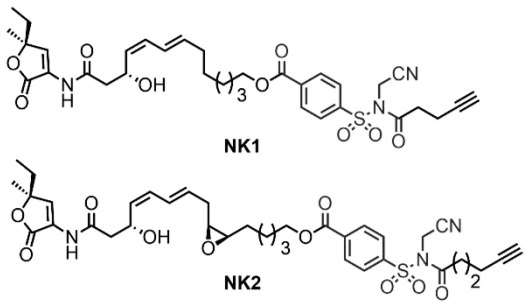


図 1. コロルミシンリガンド（NK1 および NK2）の構造

The Na^+-pumping NADH-quinone oxidoreductase (Na^+-NQR) is a crucial respiratory enzyme in many pathogenic bacteria. The X-ray crystallographic model of *Vibrio cholerae* Na^+-NQR proposed a large conformational rearrangement of the enzyme during turnover; however, there is no direct evidence that verifies this idea. If we can develop a method that enables pinpoint labeling of the Na^+-NQR by functional chemicals (such as spin probes and fluorophores), it could lead to new ways for the investigation. In this study, we developed a means of specific chemical labeling of the enzyme via ligand directed *N*-acyl-*N*-alkyl sulfonamide chemistry using synthetic ligands NK1 and NK2. The attached alkyne can serve as a “foothold” for connecting secondary functional chemicals. After short (10 min) incubation of isolate *V. cholerae* Na^+-NQR with these probes, alkyne was predominantly incorporated into the NqrB subunit, which constructs the putative quinone/inhibitor binding pocket.

Na^+-pumping NADH-quinone oxidoreductase, korormicin, chemical labeling

発表責任者：石川　萌（ishikawa.moe.83u@st.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3G03-09
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:00～ ミーティングルーム G

抗がん剤候補化合物 IACS-010759 の呼吸鎖複合体-I に対する作用機構研究

IACS-010759, a potent inhibitor of glycolysis-deficient hypoxic tumor cells, inhibits mitochondrial respiratory complex I through a unique mechanism

○村井 正俊、辻 諄人、赤尾 拓海、桝谷 貴洋、三芳 秀人（京大院農・応用生命）
○Masatoshi Murai, Atsuhito Tsuji, Takumi Akao, Takahiro Masuya, Hideto Miyoshi (Kyoto Univ. Grad. School of Agriculture)

【背景と目的】低酸素誘導因子(HIF-1α)はがん細胞の低酸素応答を制御するタンパク質であり、本因子の産生を抑制する化合物は抗がん剤の有望な候補分子と考えられてきた。2018 年にテキサス州立大学の研究チームは、HIF-1α 産生を抑制する低分子化合物 IACS-010759 を見出した(**図 1**)。報告によれば、IACS-010759 の直接的な作用点はミトコンドリア NADH-ユビキノン酸化還元酵素(呼吸鎖複合体-I)であり、本酵素を阻害することで、酸化的リン酸化への依存度の高い脳腫瘍細胞や急性骨髄性白血病細胞における HIF-1 の産生が抑制される。アセトゲニンやキナゾリンのような既知の複合体-I 阻害剤も高い抗腫瘍活性を示すものの、通常細胞に対しても顕著な毒性を示す。このことから、IACS-010759 は腫瘍細胞選択的に細胞毒性を示すユニークな複合体-I 阻害剤である可能性が高い。本研究では、IACS-010759 の複合体-I レベルでの作用機構を明らかにすることを目指した。

【方法と結果】IACS-010759 を鋳型として光親和性標識プローブ[^{125}I]IACS-010759-PD1 を合成し(**図 1**)、ウシ心筋複合体-I に対する光親和性標識実験を行った。その結果、[^{125}I]IACS-010759-PD1 は複合体-I のキノン結合ポケットを構成する ND1 サブユニットに特異的に結合することがわかった。一方で、本化合物による標識はアセトゲニンやキナゾリンなどの既知阻害剤の過剰量存在下でも抑制されなかった。以上の結果から、**IACS-010759 は既知阻害剤とは異なる作用機構で複合体-I を阻害する**ことが明らかになった。

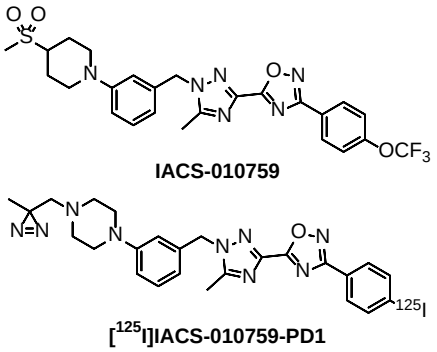


図 1. IACS-010759 とその類縁体の構造.

The small molecule IACS-010759 has been reported to inhibit the proliferation of glycolysis-deficient hypoxic tumor cells by interfering with the functions of mitochondrial NADH-ubiquinone oxidoreductase (complex I) without exhibiting cytotoxicity at tolerated doses in normal cells. Considering the significant cytotoxicity of conventional quinone-site inhibitors of complex I (such as quinazolins and acetogenins), we hypothesized that the inhibition mechanism of IACS-010759 differs from that of typical quinone-site inhibitors. To verify this idea, we investigated IACS-010759's mechanism in bovine complex I. Photoaffinity labeling experiments revealed that the photoreactive derivative [^{125}I]IACS-010759-PD1 binds to the middle of the membrane subunit ND1 and that conventional complex I inhibitors cannot suppress the binding. We conclude that the binding position of IACS-010759 differs from that of any other known inhibitor of the enzyme.

respiratory complex I, mitochondria, photoaffinity labeling

発表責任者：村井正俊（murai.masatoshi.5s@kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3G03-10
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:00～ ミーティングルーム G

出芽酵母ミトコンドリアを標的とする天然テトラミン酸誘導体 Fusaramin の作用機構研究

Mode of action study of fusaramin, a natural tetramic acid derivative targeting *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria

○運天 優歩[1]、村井 正俊[1]、坂井 克行[2]、浅見 行弘[2]、桝谷 貴洋[1]、三芳 秀人[1]([1]京大院農、[2]北里大学)

○Yufu UNTEN[1], Masatoshi MURAI[1], Katsuyuki SAKAI[2], Yukihiro ASAMI[2], Takahiro MASUYA[1], Hideto MIYOSHI[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Kitasato Univ.)

【背景と目的】ミトコンドリアにおける酸化的リン酸化（ATP 合成）を担うタンパク質群は、医農薬の研究開発における重要な標的分子である。我々はこれまでに、出芽酵母（*S. cerevisiae*）の生育阻害を指標とした評価系を用いて、新規テトラミン酸誘導体であるフサラミン(**図 1**)を子嚢菌(*Fusarium* sp.）培養液中から見出し、本化合物が酸化的リン酸化を強く阻害することを報告している。テトラミン酸を構造モチーフとして有する天然物は、これまでに 200 種類以上が単離・同定され、様々な生理活性が報告されてきたが、その標的分子が明確に同定された例はごく僅かである。本研究では、種々の活性評価系や光親和性標識実験を駆使して、出芽酵母ミトコンドリアにおけるフサラミンの標的タンパク質を同定することを目的とした。

【方法と結果】出芽酵母からミトコンドリアを単離し、[^{3}H]ADP 取り込みに対するフサラミンの影響を調べたところ、顕著な阻害が認められた。また、[^{3}H]ADP 取り込み阻害の濃度域は、酸化的リン酸化阻害の濃度域と一致したため、ミトコンドリア膜を介した ADP/ATP 輸送に関与する膜輸送体がフサラミンの標的である可能性が示唆された。そこで、フサラミンをモチーフとした光親和性標識プローブ（pFS-5, **図 1**）を合成し、酵母ミトコンドリアに対する標識実験を行ったところ、膜輸送体の一つである電位依存性アニオンチャンネル 1（VDAC1）が特異的に標識を受けた。以上の結果から、フサラミンはミトコンドリア VDAC1 に結合し、ADP/ATP 輸送を抑制することで、酸化的リン酸化を阻害していると結論した。

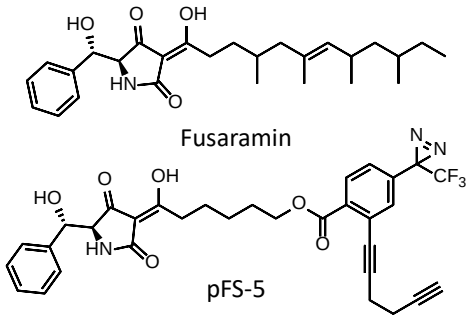


図 1. フサラミンと pFS-5 の構造.

The mitochondrial machineries presiding over ATP synthesis via oxidative phosphorylation are attractive targets for the development of medicines and agrochemicals. A natural product fusaramin (Figure 1) is an inhibitor of oxidative phosphorylation in *S. cerevisiae* mitochondria, though its target protein has yet to be identified. Fusaramin significantly interfered with [^{3}H]ADP uptake by isolated yeast mitochondria at a concentration range, where it inhibits oxidative phosphorylation. A synthetic photoreactive fusaramin derivative (pFS-5) specifically labeled voltage-dependent anion channel 1 (VDAC1), which facilitates trafficking of ADP/ATP across the outer mitochondrial membrane. These results strongly suggest that the inhibition of oxidative phosphorylation by fusaramin is predominantly attributable to the impairment of VDAC1 function.

fusaramin, mitochondria, voltage-dependent anion channel

講演番号：3G03-11
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:00～ ミーティングルーム G

ミトコンドリア呼吸鎖複合体-I を阻害する Manassantin の作用機構研究

Inhibition mechanism of manassantin as an inhibitor of mitochondrial respiratory complex I

○永岡 千草、村井 正俊、桝谷 貴洋、三芳 秀人（京大農）
○Chigusa NAGAOKA, Masatoshi MURAI, Takahiro MASUYA, Hideto MIYOSHI (Kyoto Univ.)

【背景と目的】ドクダミ科植物由来のジネオリグナンであるマナサンチン類（**図 1**）は、がん細胞の低酸素適応に関与する HIF-1α（低酸素誘導因子）の産生を抑制し、顕著な抗がん活性を示すことが知られている。その直接的な標的分子は、ミトコンドリア NADH-キノン酸化還元酵素(呼吸鎖複合体-I)であることが報告された。近年、呼吸鎖複合体-I を作用点とする抗がん剤候補分子に関する報告が相次いでおり、こうした化合物と既知の複合体-I 阻害剤との差異を明らかにすることは、複合体-I の基礎研究にとどまらず、新規な抗がん剤の分子設計に資するところも大きい。本研究では、マナサンチン類の複合体-I レベルでの作用機構を詳細に明らかにすることを目指した。

【方法と結果】Hanessian らの方法を参考にマナサンチン A を合成し、合成中間体を含めた 9 種類の類縁体について、ウシ心筋複合体-I を用いて阻害活性を評価した。その結果、THF 環の立体は阻害活性に重要であるが、類縁体 A（**図 1**）のような非対称構造であってもマナサンチン A と同程度の阻害活性が維持されたことから、分子の“対称性”は阻害に必須ではないことがわかった。

一般的な複合体-I 阻害剤は、キノン結合ポケットの内部に結合することがわかっており、キナゾリンはそうした化合物の一つである。光反応性キナゾリン[^{125}I]AzQ による光親和性標識を指標として、合成したマナサンチン類縁体との拮抗試験を行ったところ、過剰量のマナサンチン類の存在下でも、[^{125}I]AzQ による標識は完全には抑制されなかった。すなわち、マナサンチン類は既知の複合体-I 阻害剤とは異なるメカニズムで複合体-I を阻害していることが強く示唆された。

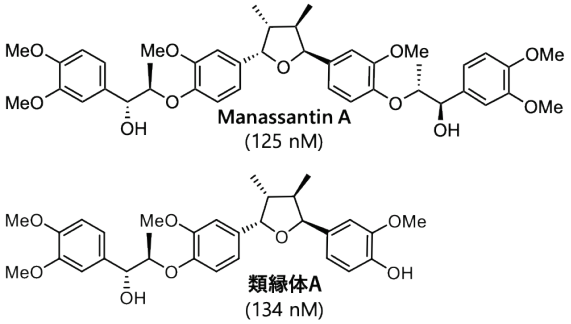


図 1. マナサンチン A および類縁体 A の構造.
括弧内にウシ複合体-I に対する IC_{50} 値を示した.

The dineolignan manassantin isolated from the plant *Saururus cernuus* is known to be a potent suppressor of hypoxia-inducing factor-1α, which plays a key role in tumor development and progression. Recently, the anti-proliferative activity of manassantin against tumor cells was found to be attributable to the inhibition of mitochondrial NADH-quinone oxidoreductase (respiratory complex I). This study aimed at characterizing the inhibition mechanism of manassantin as an inhibitor of complex I. Based on the structure-activity relationship of manassantin derivatives and their biochemical characterization, we suggest that manassantin inhibits complex I by a different mechanism from that of traditional complex I inhibitors such as quinazoline.

respiratory complex I, manassantin, photoaffinity labeling

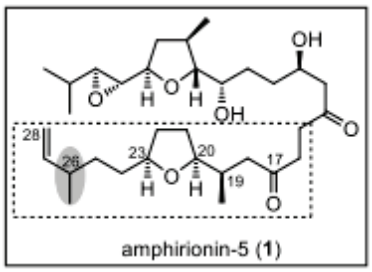
発表責任者：三芳秀人（miyoshi@kais.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3G03-12
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:00～ ミーティングルーム G

Amphirionin-5 の C17-C28 ユニットの合成研究

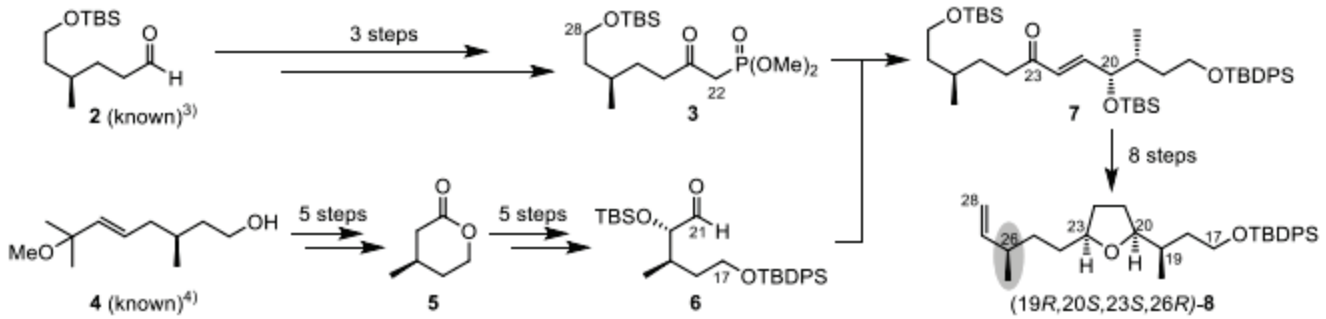
Synthetic Studies of C17-C28 Unit of Amphirionin-5

○安倍 大裕[1]、小倉 由資[2]、藤田 忠文[2]、桑原 重文[1] ([1]東北大院農、[2]東大院農)
○Daisuke ABE[1], Yusuke OGURA[2], Tadafumi FUJITA[2], Shigefumi KUWAHARA[1] ([1]Tohoku. Univ., [2]Tokyo. Univ.)



【目的】amphirionin-5 (**1**)は底生渦鞭毛藻 *Amphidinium* sp.の培養細胞から単離･構造決定された[1)]。本化合物は、10 ng/ml という低濃度において、骨芽細胞に分化可能なマウス骨髄幹細胞 ST-2 と、マウス骨芽細胞 MC3T3-E1 を強力に増殖促進する(282%, 320%)。この様に魅力的な生物活性を示す **1** であるが、その絶対立体配置が未決定なだけでなく、11 個ある不斉点の相対立体配置も部分的な提唱に留まっている[1,2)]。演者らは amphirionin-5 (**1**)の絶対立体配置の解明を最終目的として、まずは C26 位のメチル基の相対立体配置の決定を目指した C17-C28 ユニットの合成研究に着手した。

【方法・結果】まず既知の **2** [3)]から 3 工程の変換を経て C22-C28 部位 **3** を調製した。続いて、既知物質 **4** [4)]から 5 工程でラクトン **5** を調製した後、水酸基の立体選択的導入を含む 5 工程の変換により C17-C21 部位 **6** を調製した。次に **5** と **6** を連結し THF 環と末端二重結合の形成を経て、C17-C28 ユニットとして考え得るジアステレオマーの一つである(19*R*,20*S*,23*S*,26*R*)- **8** の合成を完了した。



Amphirionin-5 (**1**) was isolated from the marine benthic dinoflagellate *Amphidinium* sp. strain KCA09053,[1)] which was revealed to strongly promote the proliferation of murine bone marrow stromal ST-2 cells and murine osteoblastic MC3T3-E1 cells (282%, 320%) at quite a low concentration of 10 ng/ml. While the relative stereochemistries of eleven stereogenic centers of **1** were partially determined,[1,2)] the one at C26 for C23 has been remained to be unassigned, which prompted us to synthesize the carbon chain unit around C26 of **1** to determine its relative stereochemistry. In this conference, we will report the details of the synthetic studies of C17-C28 unit of amphirionin-5 (**1**) and comparison of the NMR data of the synthetic sample with those of natural product.

1) M. Tsuda *et al. Tetrahedron Lett.* **2014**, *55*, 3491–3494. 2) M. Sasaki *et. al. Org. Lett.* **2016**, *18*, 112–115.
3) E. J. Thomas *et al. J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1985**, 143-145.
4) P. G. Harran *et al. J. Am. Chem. Soc.*, **2018**, *140*, 1280.

Amphirionin-5, polyketide, structural determination

講演番号：3G03-13
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:00～ ミーティングルーム G

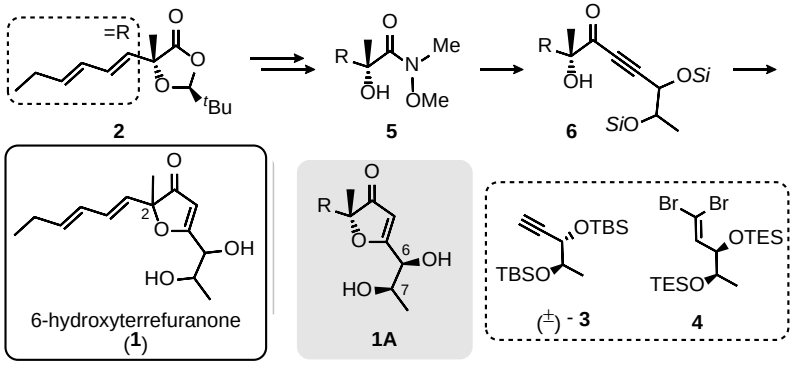
6-Hydroxyterrefuranone の全合成と立体化学の解明

Total synthesis and elucidation the stereochemistry of 6-Hydroxyterrefuranone

○岡 悠介、髙橋 和暉、桑原 重文、榎本 賢（東北大院農）
○Yusuke OKA, Kazuki TAKAHASHI, Shigefumi KUWAHARA, Masaru ENOMOTO (Grad. Sch. of Agric., Tohoku Univ.)

【背景・目的】6-Hydroxyterrefuranone (**1**)は *Microdiplodia* 種の植物内生真菌より単離された新規ポリケチドである [1)]。本化合物は数種の細菌に対する抗菌活性を持つことが報告されている一方で、化学構造については平面構造の決定にとどまっており、立体化学は未決定である。そこで合成化学的アプローチによる **1** の立体化学決定と全合成を目的として研究を行った。

【方法・結果】まず、C2 位が *R* の絶対立体配置をもつ既知化合物 **2**[2)]から数工程の変換で **5** を調製した。このものに対して別途調製したジオールセグメント(±)-**3**、**4** 及び *ent*-**4** をそれぞれ付加して 4 種類の **6** のジアステレオマーを得たのちに，これらに対して 5-*endo* 環化と脱保護を一挙に行うことで天然物と同一の平面構造を持つ化合物を合成した。得られた 4 種類のジアステレオマーの NMR データを天然物と比較した結果、**1A** で示した相対立体配置を持つ化合物が天然物と良い一致を示した。現在、天然物の絶対立体配置の決定と全合成達成を目指して研究を進めている。



1) Y. Shiono *et al., Nat. Prod. Comm.* **2012**, 7, 1065. 2) H. B. Stoll and R. Bruckner, *Eur. J. Org. Chem.* **2012**, 3978.

6-Hydroxyterrefuranone (**1**) was isolated from the fermentation extract of endophytic fungus *Microdiplodia* sp. as its metabolite exhibiting antimicrobial activity.[1)] Although the planar structure of **1** was determined based on spectroscopic analyses, the relative and absolute stereochemistry of **1** was left unassigned. Thus, we aimed to elucidate the complete stereochemistry of **1** through synthesis.

Nucleophilic addition of alkynyllithium species prepared from each of the diol segment, (±)-**3**, **4,** and *ent*-**4,** to the diene segment **5**, which was synthesized from known compound **2** in two steps,[2)] gave four diastereomers of **6**. Each diastereomer of **6** was converted into the corresponding diastereomer of **1** via 5-*endo* cyclization. Comparison of the ^{1}H and ^{13}C NMR spectra of the synthetic samples with those of natural 6-hydroxyterrefuranone revealed that the relative stereochemistry of 6-hydroxyterrefuranone would be represented by structure **1A**.

total synthesis, natural product, stereochemistry

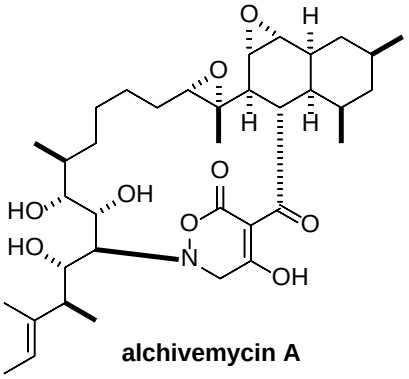
講演番号：3G03-14
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:00～ ミーティングルーム G

アルキベマイシン A の合成研究

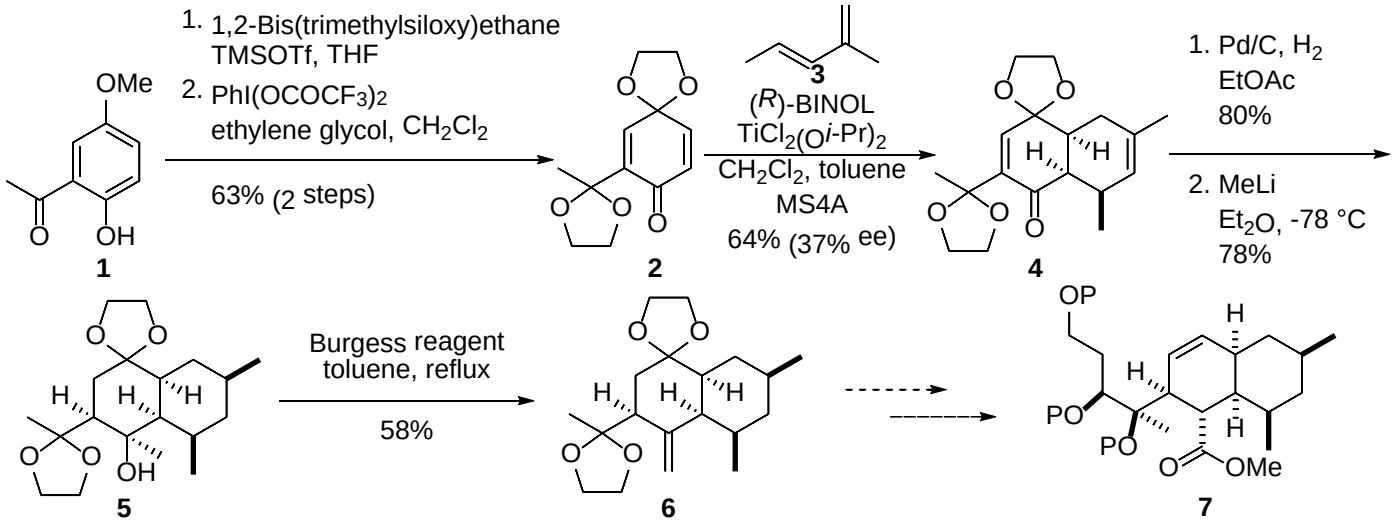
Synthetic Study of Alchivemycin A

○印藤 寛二[1]、占部 大介[1,2]、深谷 圭介[1,2] ([1]富山県大工、[2]富県大生医工研セ)
○Kanji INDO[1], Daisuke Urabe[1,2], Keisuke Fukaya[1,2] ([1]Toyama Pref. Univ., [2]Biotechnol. Res. Center, Toyama Pref. Univ.)

アルキベマイシン A は植物由来の放線菌 *Streptmyces* 属から単離された多環式ポリケチドであり、一部のグラム陽性細菌に対する選択的な抗菌活性を示す[1)]。本研究では、アルキベマイシン A の全合成を目指し、シスデカリンフラグメント **7** の構築を試みた。



1 を出発原料として、アセタール保護、酸化的脱芳香族化によりキノンモノケタール **2** とした。得られた **2** に対し、ジエン **3** 存在下、三上らの不斉 Diels-Alder 反応の条件[2)]に付すことで、望みのシスデカリン **5** を収率 64%(37% ee)で得た。その後、立体選択的な水素添加、メチル基の導入によって **4** を **5** とし、Burgess 試薬を用いて、エキソオレフィン **6** を合成した。今後はエキソオレフィンの官能基化により、シスデカリンフラグメント **7** を導く。



Alchivemycin A isolated from the culture extract of a plant-derived actinomycete Streptomyces sp., shows potent antimicrobial activity against *Micrococcus luteus*. In this study, we synthesized decalin fragment **6** toward total synthesis of alchivemycin A.

1) Igarashi, Y.; Kim, Y.; In, Y.; Ishida, T.; Kan, Y.; Fujita, T.; Iwashita, T.; Tabata, H.; Onaka, H.; Furumai, T. Org. Lett. 2010, 12, 3402.
2) Mikami, K.; Terada, M.; Motoyama, Y.; Nakai, T. Tetrahedron: Asymmetry, 1991, 2, 643.

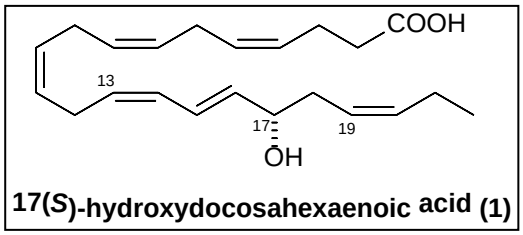
Natural Product Synthesis, Organic Chemistry, Alchivemycin A

講演番号：3G03-15
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:00～ ミーティングルーム G

17-ヒドロキシドコサヘキサエン酸の合成研究

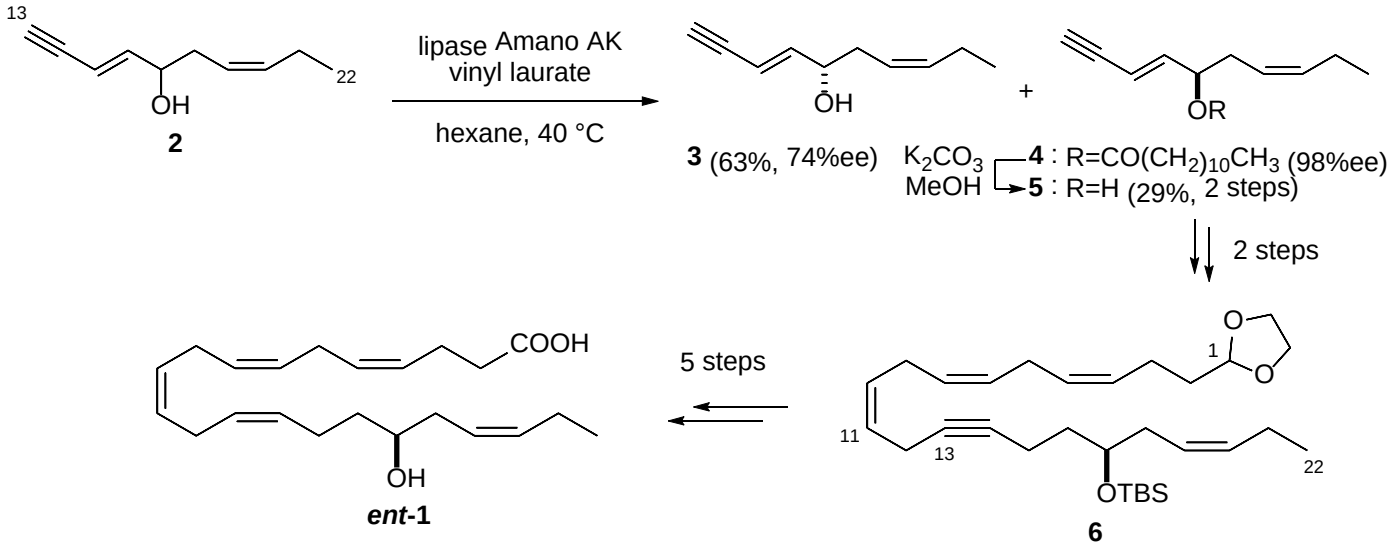
Synthetic Study of 17-Hydroxydocosahexaenoic acid

○岩井 柚樹[1]、深谷 圭介[1,2]、占部 大介[1,2]（[1]富山県大院工、[2]富県大生医工研セ）
○Yuki IWAI[1], Keisuke FUKAYA[1,2], Daisuke URABE[1,2] ([1]Toyama Pref. Univ., [2]Biotechnol. Res. Center, Toyama Pref. Univ.)



ドコサヘキサエン酸の酸化代謝物である 17-ヒドロキシドコサヘキサエン酸**(1)**は、前立腺がん細胞の増殖抑制や慢性腎臓病における軽度の炎症亢進抑制などの機能性が確認されている。しかし、抗炎症機能を引き起こす詳細な分子機構は解明されていない。我々は活性発現機構の解明および構造活性相関研究に必須となる **1** の量的供給を目的とし、その合成経路の確立に着手した。

アルコール **2** に対してラウリン酸ビニル存在下、リパーゼを用いて光学分割し、(*S*)-アルコール **3** および、(*R*)-アシル化体 **4** を得た。得られた **4** からテトラエン **6** を経由し、 ***ent*-1** を合成した。



17-Hydoroxydocosahexaenoic acid (**1**), a metabolite of docosahexaenoic acid, is a lipid mediator having growth suppression activity for prostate cancer cell. To supply **1** and its analogs for further biological study, we planned to establish a synthetic route of **1**. Lipase-mediated kinetic resolution of **2** provided **4** in 98% ee. From **4**, ***ent*-1** was successfully synthesized in 8 steps.

Natural Product Synthesis, Organic Chemistry, Lipid

講演番号：3G03-16
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:00～ ミーティングルーム G

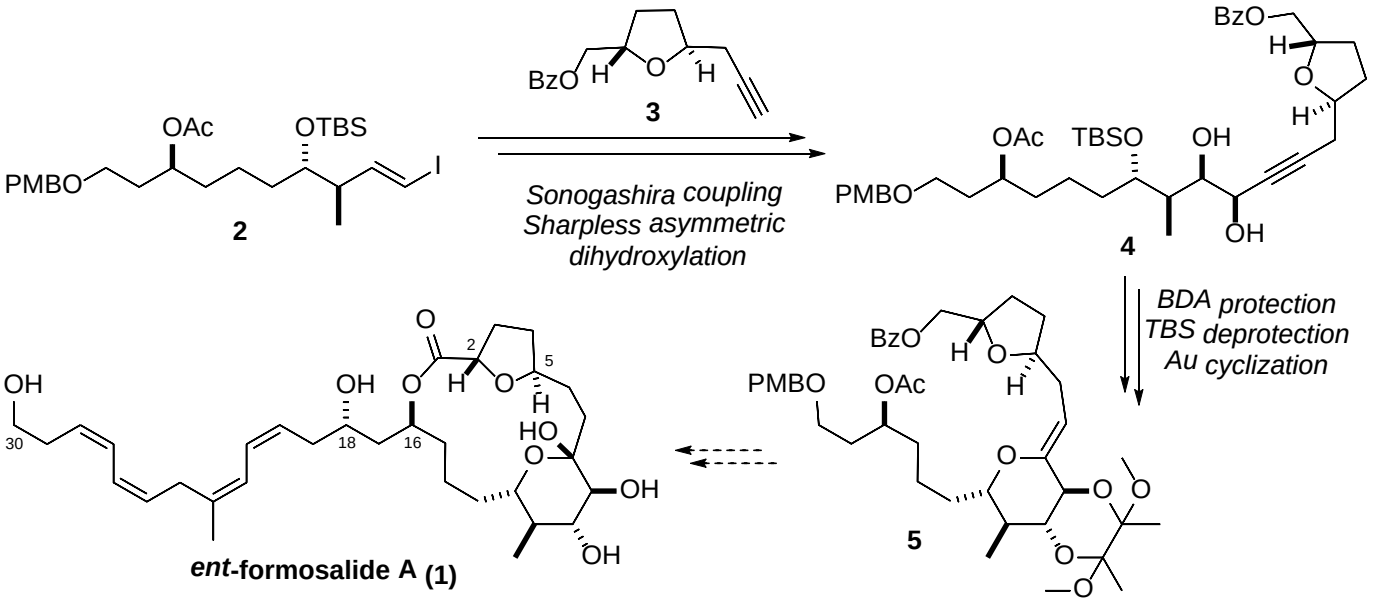
ホルモサリド A の合成研究

Synthetic Study of Formosalide A

○茂住 梨紗[1]、駒津 友美[1]、深谷 圭介[1,2]、占部 占部[1,2] ([1]富山県大工、[2]富県大生医工研セ)
○Risa MOZUMI[1], Tomomi KOMATSU[1], Keisuke FUKAYA[1,2], Daisuke URABE[1,2] ([1]Toyama Pref. Univ., [2]Biotechnol. Res. Center, Toyama Pref. Univ.)

ホルモサリド A(**1**)は、海洋性渦鞭毛藻 *Prorocentrum* sp.より単離された 17 員環マクロリドであり、白血病細胞と結腸腺ガン細胞に対する細胞毒性が報告されている [1)]。我々は、構造活性相関研究を視野に入れた合成経路確立を目指し、***ent*-1** の合成研究を行った [2)]。

TIPS アセチレンから 10 工程で誘導したヨウ化ビニル **2** と 1,2-エポキシ-5-ヘキセンから 5 工程で誘導したテトラヒドロフラン **3** から薗頭カップリング及び Sharpless 不斉ジヒドロキシル化により、ジオール **4** を合成した。**4** に対しブタン 1,2-ジアセタール（BDA）保護を経て、金触媒により環化させ、**5** を得た。



Formosalide A (**1**) is a cytotoxic 17-membered ring macrolide, isolated from *Prorocentrum* sp. Toward a SAR study, we planned to establish of synthetic route of **1**.

Diol **4** was synthesized from vinyl iodide **2** and tetrahydrofuran ring **3** by using Sonogashira coupling and Sharpless dihydroxylation. After the protection of diol, the Au-mediated cyclization provided **5**.

1) Lu, C.-K.; Chen, Y.-M.; Wang, S.-H.; Wu, Y.-Y.; Cheng, Y.-M. *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 1825.
2) Fürstner, A.; Schulthoff, S.; Hamilton, J,-Y.;Heinrich, M.; Kwon, Y.; Wirtz, C. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2020**, *59*, 2.

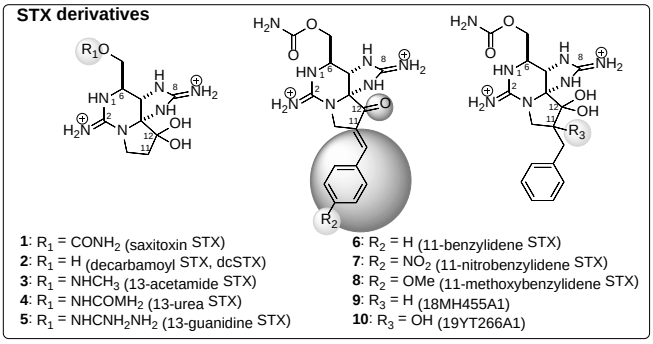
Natural Product Synthesis, Organic Chemistry, Total synthesis

講演番号：3G05-01
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 11:00～ ミーティングルーム G

合成サキシトキシン誘導体に対する電位依存性ナトリウムチャネルの感受性評価

Sensitivity of the voltage-gated sodium channels against synthetic saxitoxin derivatives

○千葉 修[1]、山田 智士[1]、角替 俊輔[1]、島田 紀子[1]、長 由扶子[1]、高柳 優夏[2]、星 美波[2]、安達 栞菜[2]、石塚 颯[2]、長澤 和夫[2]、山下 まり[1]、此木 敬一[1] ([1]東北大農、[2]東京農工大工)
○Osamu CHIBA[1], Tomoshi YAMADA[1], Shunsuke TSUNOGAE[1], Noriko SHIMADA[1], Yuko CHO[1], Yuka TAKAYANAGI[2], Minami HOSHI[2], Kanna ADACHI[2], Hayate ISHIZUKA[2], Kazuo NAGASAWA[2], Mari YOTSU-YAMASHITA[1], Keiichi KONOKI[1] ([1]Tohoku Univ. Agr., [2]Tokyo Univ of Agri & Tech)



【背景と目的】電位依存性ナトリウムチャネル（Na_v）は活動電位の起点および伝搬を司り、その機能不全は心臓疾患、神経障害性疼痛、癲癇などの原因となる。Na_vには 9 つのサブタイプ（$Na_v1.1$-1.9）が存在し、心筋や骨格筋など部位により発現するサブタイプは異なるため、各種疾病治療のためにサブタイプ選択的阻害剤の開発が求められている。Na_vの特異的阻害剤である saxitoxin（STX, **1**）には数多くの類縁体が存在し、僅かな構造の差異が生み出すサブタイプ選択性の獲得が期待されている。本研究では、合成 STX 誘導体に対する Na_vの感受性を評価することを目的とした。

【実験方法】リン酸カルシウム法を用いて 293T 細胞に対して $Na_v1.2$, $Na_v1.5$, $Na_v1.7$ を一過性発現させた。ホールセル記録法を用いて Na^+電流を観測し、各 STX 誘導体（**2**-**10**）の Na_v阻害活性を調べた。また、veratridine/ouabain Neuro2A assay (Neuro2A assay)でも阻害活性を調べた。

【結果と考察】**3**-**5** は 300 nM にて各 Na_vを阻害しなかった。**6** は $Na_v1.2$ を阻害したが（IC_{50}: 5.2 ± 0.8 nM, n = 3）、解離が遅いため不可逆的結合が示唆された。しかし、**7**、**8** はともに顕著に $Na_v1.2$ を阻害し（IC_{50}: 14.9 ± 5.1 nM (**7**); 32.1 ± 3.2 nM (**8**), n = 3）、差異は見られなかった。一方、**10** は Na_vを可逆的に阻害し（IC_{50}: 27.0 ± 5.6 nM, n = 3）、**9** は 300 nM にて阻害活性を示さなかった。Neuro2A assay でもほぼ同じ傾向が示されたが、**10** より弱いながら **9** にも活性は認められた。

Voltage-gated sodium channels (Na_v) trigger and propagate the action potential and cause heart disease, neuropathic pain and epilepsy due to their dysfunction. Nine Na_v subtypes from $Na_v1.1$ to 1.9 are known to express in different organs, and subtype selective inhibitors are anticipated to be therapeutic source against the aforementioned diseases. Saxitoxin, the primary paralytic shellfish toxin, inhibits Na_v, while many natural and synthetic analogues are not investigated for sensitivity to each Na_v subtype. In this presentation, we report nine synthetic analogues for their subtype selective inhibition of Na_v.

1) Adachi, K. *et al.*, *Chem. Eur. J.* **2020**, *26*, 2025-2033.

saxitoxin, voltage-gated sodium channel, electrophysiology

発表責任者：此木　敬一（keiichi.konoki.b2@tohoku.ac.jp）

講演番号：3G05-02
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 11:00～ ミーティングルーム G

電位依存性ナトリウムチャネルを阻害するクロイソカイメン抽出物の探索

Screening of voltage-gated sodium channel blockers from the marine sponge Halichondria okadai

○島田 紀子、千葉 修、角替 俊輔、長 由扶子、山下 まり、此木 敬一（東北大農）
○Noriko Shimada, Osamu Chiba, Shunsuke Tsunogae, Yuko Cho, Mari Yotsu-Yamashita, Keiichi Konoki (Tohoku Univ. Agr.)

【目的】電位依存性ナトリウムチャネル（Na_v）は活動電位の起点となり、その伝搬を司る。神経障害性疼痛、癲癇、心臓疾患等、Na_v を原因とする各種疾病治療のリードとなる医薬資源の探索は重要な課題である。本研究では電気生理学的手法を用い、オカダ酸やハリコンドリン B 等、強力な毒性を示す天然物の宝庫であるクロイソカイメン（*Halichondria okadai*）抽出物より新規 Na_v 阻害剤を探索することを目的とする。
【方法】（１）*H. okadai* をアセトンで抽出し、抽出液を減圧濃縮後、ヘキサン、クロロホルム、ブタノールにて順次、抽出したのち、（２）に述べる方法にて Na_v 阻害活性を示した画分を順次、シリカゲルカラムクロマトグラフィー、逆相 HPLC により分画精製した。
（２）電気生理学的手法の一種であるホールセル記録法は、膜電位に依存して細胞外から細胞内へ Na^+ を流入させる Na_v の測定に最適である。マウス神経芽細胞腫 Neuro 2A に対してホールセル記録法を適用し、Na^+ 電流の大きさや活性化ゲート・不活性化ゲートの開閉確率に影響を及ぼす画分を調べた。
【結果と考察】ヘキサン画分より Na_v 阻害活性を示す化合物を精製したが、微量のため構造決定に至らなかった。再度、同一の分画経路で分画・精製を試みたが、得られた化合物はアラキドン酸であった。現在、再々精製を試みつつ、市販のアラキドン酸、類似の脂肪酸の Na_v 阻害活性を評価中である。

Voltage-gated sodium channels (Na_v) trigger and propagate the action potential and causes heart disease, neuropathic pain and epilepsy due to their dysfunction. In this presentation, we conducted whole-cell patch-clamp experiments using neuroblastoma Neuro 2A cells and attempted to isolate Na_v inhibitors from the marine sponge, *Halichondria okadai*, which is known to accumulate okadaic acid, halichondrin B and etc. Initial screening enabled us to isolate a compound, whereas its structure could not be determined due to poor quantity. We repeated the purification from a large amount of the same specimen but only identified arachidonic acid up to date. The third round of purification together with investigation of inhibitory activities of commercially available arachidonic acid and other lipids against Na_v is now undergoing.

Halichondria okadai, voltage-gated sodium channel, electrophysiology

発表責任者：此木　敬一（keiichi.konoki.b2@tohoku.ac.jp）

講演番号：3G05-03
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 11:00～ ミーティングルーム G

活性窒素種による細胞傷害から細胞を保護する化合物の作用機構解析および抗炎症作用の検討

Investigation of the cytoprotective against RNS-induced cytotoxicity mechanism and evaluation of its anti-inflammation activity

○鶴川 幸音[1]、菅野 和紀[1]、鈴木 優華[1]、村上 裕信[1]、竹田 志郎[1]、永根 大幹[1]、坂上 元栄[1]、曽川 一幸[1]、篠田 陽[2]、紙透 伸治[1] ([1]麻布大獣医、[2]東薬大薬)
○ Yukine Tsurukawa[1], Kazuki Kanno[1], Yuka Suzuki[1], Hironobu Murakami[1], Shiro Takeda[1], Masaki Nagane[1], Motoharu Sakaue[1], Kazuyuki Sogawa[1], Yo Shinoda[2], Shinji Kamisuki[1] ([1]Azabu Univ., [2]Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences)

活性窒素種 (RNS) は細胞に酸化ストレスを与え、細胞傷害を誘導する。また、RNS による細胞傷害は神経変性疾患や炎症疾患との関連が示唆されている。我々は、RNS である $ONOO^-$供与体; SIN-1 による細胞傷害から神経様細胞に分化したラット副腎褐色細胞腫 (PC12) を保護する pestalotioquinol A (pesA) を見出し、作用機構解析を行ってきた [1]。これまでの研究により、pesA の細胞保護作用は培地中から pesA を除去後も維持されることや $ONOO^-$や•NO などの RNS による細胞傷害特異的に示されることが示唆されており、pesA は他の抗酸化物質とは異なる特徴を持つことが明らかとなっている。そこで、本研究では pesA が PC12 以外の細胞でも、細胞保護作用を示すか検討した。ヒト神経芽細胞 (SH-SY5Y) などの神経細胞やヒト乳がん細胞 (MDA-MB-231) などを用いて、細胞保護活性試験を行った結果、pesA は全ての細胞において細胞保護作用を示さなかった。この結果から、pesA は PC12 特異的に細胞保護作用を示すことが示唆された。次に、RNS は炎症疾患との関連が示唆されているため、pesA が抗炎症作用を示すか検討した。RAW264.7 細胞に pesA を添加後、LPS 刺激を行った。その後、インターロイキン 6 (IL-6) 産生量を定量した。その結果、pesA により IL-6 の産生が有意に抑制され、pesA が抗炎症作用を示す可能性が示された。

Reactive nitrogen species (RNS) is known to induce oxidative stress and related to various diseases such as neurodegenerative diseases and inflammatory diseases. We have been performed a screening for compounds that protect cells from RNS-induced cytotoxicity, and pestalotioquinol A (pesA) was found to display cytoprotective activity against $ONOO^-$ donor; SIN-1-induced cytotoxicity [1]. Our previous study has been revealed the cytoprotective activity of pesA is specific for RNS such as $ONOO^-$ and •NO donor-induced cytotoxicity and sustained even after removal of pesA from the medium. In this study, we investigated whether pesA suppresses cell death of other cell lines. We tested the protective activity of pesA using human breast cancer; MDA-MB-231 cells and neuronal cells such as SH-SY5Y cells. As a result, pesA did not protect all tested cells from SIN-1-induced cytotoxicity. This result indicated pesA shows selective cytoprotective activity for PC12 cells. Next, since RNS is associated with inflammatory diseases, we examined the effect of pesA on LPS-stimulated proinflammatory cytokine production of RAW264.7 cells. As a result, pesA significantly inhibited interleukin-6 (IL-6) production, which suggested that pesA displayed anti-inflammatory activity.

[1] Kanno K *et al. J. Antibiot.*72:793-799. 2019

reactive nitrogen species (RNS), cytoprotection, anti-inflammation

発表責任者：紙透伸治（kamisuki@azabu-u.ac.jp）

講演番号：3G05-04
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 11:00～ ミーティングルーム G

新規肝臓 X 受容体アンタゴニストの探索とその抗 C 型肝炎ウイルス活性

Discovery of a Novel LXR antagonist and its anti-hepatitis C virus activity

○齋藤 史季[1]、太田垣 潤一郎[1]、大橋 啓史[2]、西岡 華実[2]、中村 洸[1]、鶴川 幸音[1]、柴崎 久宣[1]、菅野 和紀[1]、村上 裕信[1]、永根 大幹[1]、岡田 麻衣子[3]、倉持 幸司[4]、渡士 幸一[2]、紙透 伸治[1]([1]麻布大獣医、[2]感染研ウイルス第二部、[3]東京工科大応用生物、[4]東理大理工)
○ Shiki SAITOH[1], Junichiro OTAGAKI[1], Hirohumi OOHASHI[2], Kazane NISHIOKA[2], Kou NAKAMURA[1], Yukine TSURUKAWA[1], Hisanobu SHIBASAKI[1], Kazuki KANNO[1], Hironobu MURAKAMI[1], Masaki NAGANE[1], Maiko OKADA[3], Kouji KURAMOCHI[4], Kouichi WATASHI[2], Shinji KAMISUKI[1] ([1]Azabu Univ., [2]National Institute of Infectious Diseases, [3]Tokyo Univ. of Technology, [4]Tokyo Univ. of Science)

C 型肝炎ウイルス (HCV) は高率に慢性肝炎を引き起こし、持続感染により肝硬変や肝がんへと進行する。現在、C 型肝炎の治療は HCV を直接標的する Direct Acting Antiviral (DAA) が用いられるが、この治療法によって生じた薬剤耐性ウイルスへの対策が課題となっている。

これまでの研究で、真菌の二次代謝産物である neoechinulin B が肝臓 X 受容体 α (LXRα) の転写活性を特異的に抑制することで細胞内膜再編成および脂肪蓄積を阻害し、HCV の複製を抑制することを明らかにしている。LXRα はコレステロールなどの脂質代謝に関わるため、LXRα を標的とすれば HCV の薬剤耐性の問題を解決できるだけでなく、非アルコール性脂肪肝炎の治療も期待できる。そこで本研究では、LXRα のアンタゴニスト活性を持つ化合物を見出すことを目的とした。当研究室で構築された化合物ライブラリーにある約 1000 種の化合物からヒト肝臓がん由来細胞である HuH-7 細胞を用いたレポーターアッセイによりスクリーニングを行った。その結果、LXRα のアンタゴニスト活性を持つ新規化合物が得られた。LXR アゴニストである T0901317 を HuH-7 細胞に処理すると脂肪滴の蓄積が誘導されるが、この化合物と共処理すると脂肪滴の蓄積が抑制された。さらに、HCV を感染させた HuH-7 細胞にこの化合物を処理すると HCV 産生を低下させた。以上のように、今回得られた新規化合物は LXRα を介して脂肪蓄積を阻害し、HCV の産生を抑制することが示唆された。

Hepatitis C virus (HCV) causes both acute and chronic hepatitis, and persistent HCV infection often progresses to cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Previously, our group reported that neoechinulin B inhibited the accumulation of lipid droplets by specifically suppressing the transcriptional activity of LXRα, and block the HCV replication. Since LXRα plays a major role in cholesterol metabolism, LXRα would be potential target for the treatment for both hepatitis C and steatohepatitis. Here, we screened for LXRα antagonist by a reporter assay using Huh-7. As a result, we discovered a novel compound as a LXRα antagonist. In addition, this compound was found to inhibit production of HCV and accumulation of lipid droplet.

Liver X Receptor, Hepatitis C virus, antiviral compound

発表責任者：齋藤史季（ma2011@azabu-u.ac.jp）

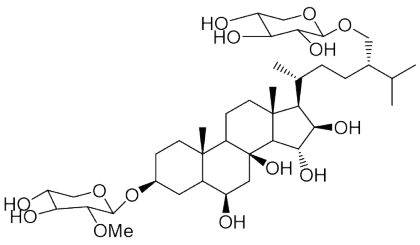
講演番号：3G05-05
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 11:00～ ミーティングルーム G

神経成長因子活性を増強する天然物の遺伝子発現解析

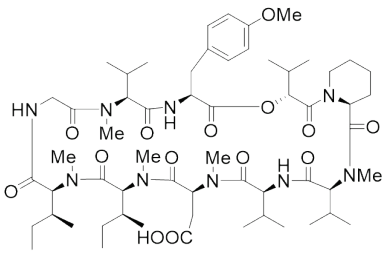
Gene expression analysis of NGF-enhancing natural products

○森川 綾音[1]、田中 愛子[1]、鈴木 孝征[2]、小鹿 一[1]([1]名大院生命農、[2]中部大応生)
○Ayane MORIKAWA[1], Aiko TANAKA[1], Takamasa SUZUKI[2], Makoto OJIKA[1] ([1]Nagoya Univ., [2]Chubu Univ.)

【背景・目的】 当研究室では神経モデル細胞である PC12 細胞を用い、神経成長因子（NGF）増強活性物質の探索を行っている。acanthasteroside B3 および clavariopsin A は当研究室においてオニヒトデおよび水生不完全菌からそれぞれ単離された天然物であり、PC12 細胞に対し NGF 増強活性を示す。これらの天然物による NGF 増強の作用機構解明の一環として RNA-seq による遺伝子発現変動解析を行った。



acanthasteroside B3



clavariopsin A

【方法・結果】PC12 細胞に化合物およびわずかに突起伸長を示す程度の NGF (0.5 ng/mL)、またはコントロールとして約 60%の突起伸長率を示す濃度の NGF (2.0 ng/mL)を投与し、1、6、24、48 時間後に細胞を回収し、total RNA を抽出した。RNA-seq により発現遺伝子の解析を行ったところ、acanthasteroside B3 (40 μM)の投与により、単独で高濃度の NGF を投与した場合と同様の発現パターンを示したことから、acanthasteroside B3 は NGF の活性を何らかの作用で増強することで突起伸長を誘導していると考えられる。現在はさらに詳しい解析を進めると共に、構造的に大きく異なる NGF 増強活性物質 clavariopsin A について、同様の解析を進めている。

We use PC12 cells, neuron model cells, to search for nerve growth factor (NGF)-enhancing substances. Acanthasteroside B3 and clavariopsin A are natural products isolated a starfish and an aquatic fungus, respectively. They exhibit NGF-enhancing activity to PC12 cells. To unveil how they work, gene expression analysis with RNA-seq was conducted.

NGF (0.5 ng/mL) inducing slight neuronal outgrowth to PC12 cells and a compound, or NGF (2.0 ng/mL) inducing significant outgrowth as control, were administered to PC12 , and the cells were incubated for 1, 6, 24, or 48 hours. Total RNAs were extracted and subjected to RNA-seq. A similar gene expression pattern was observed between NGF-treated and acanthasteroside B3-treated cells, suggesting that acanthasteroside B3 induces neuronal differentiation by enhancing the NGF signal pathway. Currently, detailed analysis is being carried out, and similar analyses of clavariopsin A is underway.

NGF, PC12, neuronal differentiation

講演番号：3G05-06
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 11:00～ ミーティングルーム G

糸状菌 *Acremonium persicinum* が産生する抗真菌化合物 ASP2397 の生合成遺伝子の同定とシデロフォア機能の解析

Biosynthetic Gene and Cellular Function of Antifungal Agent ASP2397 Produced by The Filamentous Fungus *Acremonium persicinum*

○浅井 良樹[1]、西村 慎一[1,2]、平塚 知成[1,2]、河村 優美[4]、吉田 稔[1,2,3,5]([1]東大院農・応生工、[2]東大微生物連携機構、[3]理研 CSRS・ケミカルゲノミクス、[4]理研 CSRS・分子リガンド標的、[5]理研 CSRS・創薬シード)

○ Yoshiki ASAI[1], Shinichi NISHIMURA[1,2], Tomoshige HIRATSUKA[1,2], Yumi KAWAMURA[4], Minoru YOSHIDA[1,2,3,5] ([1]Dept. Biotechnol., Univ. Tokyo, [2]CRIIM, UTokyo, [3]Chem. Genomics Res. Gr., RIKEN CSRS, [4]Mol. Ligand Target Res. Team, RIKEN CSRS, [5]Drug Discov. Seed Cpd. Exploratory Unit, RIKEN CSRS)

鉄は生物における必須微量元素であり、微生物や植物は環境中から鉄を獲得するためにシデロフォアと呼ばれる低分子のキレーターを分泌する。ASP2397 は糸状菌 *Acremonium persicinum* MF-347833 が産生する、強力な抗真菌活性を持つ環状ヘキサペプチドである。その構造は糸状菌シデロフォアであるフェリクロシンに酷似しており、異種真菌のシデロフォア輸送システムをハイジャックして細胞内に取り込まれる。ところが生産者自身も糸状菌であり、その生産調節機構や生理機能に興味が持たれる。本研究では ASP2397 や他のシデロフォアの生合成遺伝子探索と機能解析を行った。

まず生産菌を種々の条件で培養したところ、鉄飢餓条件下で ASP2397 が産生されその多くが菌体外に分泌されていたが、自身のフェリクロシン様化合物はほとんど生産されていなかった。一方、鉄添加条件下では ASP2397 の生産が見られなくなり、逆にフェリクロシン様化合物が菌体内に蓄積していた。そこで生産菌のゲノムを解析すると、ASP2397 またはフェリクロシン様化合物を合成すると予想される非リボソームペプチド合成酵素(NRPS)が見出された。これらの遺伝子はそれぞれ鉄欠乏条件と鉄添加条件で転写量が大きく上昇していた。そこでまず ASP2397 の推定 NRPS を破壊したところ、期待通り破壊株では ASP2397 の産生能は失われ、異種真菌との対峙培養ではその生育阻害が見られなくなった。さらに培養液に鉄キレート体の ASP2397 を添加したところ、生産菌は ASP2397 をシデロフォアとしても利用できることが示唆された。現在はフェリクロシン様化合物の推定 NRPS を破壊し、代謝産物解析や鉄に対する感受性試験を進めており、それらも併せて発表する予定である。

Microorganisms and plants secrete siderophores to acquire iron from the environment. ASP2397 is a novel antifungal agent produced by the filamentous fungus *Acremonium perisicinum* MF-347833 and its structure closely resembles the fungal siderophore, ferricrocin. We explored the biosynthetic genes and physiological function of ASP2397 and other siderophores.

ASP2397 was produced under iron starvation, of which majority was secreted out of the cell, while the ferricrocin-like compound was accumulated inside the cell during iron sufficiency. The deletion of the gene encoding putative NRPS of ASP2397 resulted in the loss of the ASP2397 production. Furthermore, we found that the strain producing ASP2397 can use ASP2397 as a siderophore for itself. Disruption of the putative NRPS gene for the other ferricrocin-type siderophore is under way.

filamentous fungus, antifungal, iron

発表責任者：浅井 良樹（yyoosshhiikkii1997@gmail.com）

講演番号：3G05-07
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 11:00～ ミーティングルーム G

ステロール標的型天然物を用いた細胞極性とステロールの関係性の探索
Exploring the relationship between cell polarity and sterols using sterol-targeting natural products

○中尾 拳典[1]、菅長 昭文[2]、西村 慎一[2,3]、松山 晃久[2,4]、吉田 稔[2,3,4,5]([1]東大農・生化工、[2]東大院農・応生工、[3]東大 微生物連携機構、[4]理研 CSRS・ケミカルゲノミクス、[5]理研 CSRS・創薬シード)
○Kensuke NAKAO[1], Akihumi SUGANAGA[2], Shinichi NISHIMURA[2,3], Akihisa MATSUYAMA[2,4], MINORU YOSHIDA[2,3,4,5] ([1]Dept. Biotechnol. UTokyo, [2]Dept. Biotechnol, UTokyo, [3]CRIIM, UTokyo, [4]Chem. Genomics Res. Gr., RIKEN CSRS, [5]Drug Discov. Seed Cpd. Exploratory Unit, RIKEN CSRS)

海綿由来の天然有機化合物セオネラミド（TNM）は細胞膜ステロールを標的にする抗真菌物質で、分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* に急激な膜損傷を引き起こすことなく細胞壁の主成分である 1,3-β-グルカンの異常蓄積を誘導するというユニークな生物活性を示す。この蓄積は、膜ステロールに TNM が結合しβ-グルカン合成酵素である Bgs タンパク質の局在が変化することで誘導されていると考えられるが、この局在変化の分子機構は不明であり、他にどのような膜タンパク質の細胞内局在が TNM の影響を受けるのか知見に乏しい。そこで本研究では、これらの疑問を明らかにするために、TNM により細胞内局在に影響を受けるタンパク質をゲノムワイドに探索することにした。

我々のグループでは、分裂酵母のほぼ全ての ORF をクローニングし、それらを YFP 結合タンパク質として発現する過剰発現株ライブラリーを用いた全タンパク質細胞内局在データベース（localizome）を構築している。Localizome によって細胞辺縁部あるいは成長端・分裂面に局在すると分類されている 392 の ORF を対象に、TNM により細胞内局在が変化するものを探索すると、約 110 の膜タンパク質の細胞内局在が TNM によって影響を受けることがわかった。そのうち 30 余りのタンパク質は細胞壁異常箇所に局在・集積し、それらには細胞骨格形成や細胞内輸送に関連するものが含まれていた。本発表では、細胞内局在の観点から TNM との相互作用が認められたタンパク質について報告し、それらが細胞極性関連因子として細胞壁異常を誘導する可能性について議論する。

Theonellamides (TNMs) are antifungal substances that target membrane sterols. They show a unique biological activity of inducing abnormal accumulation of 1,3-ß-glucans in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. We speculate that this accumulation is induced by altered localization of Bgs proteins, 1,3-ß-glucan synthases, followed by binding of TNMs to membrane sterols. In this study, we conducted a genome-wide screen for proteins whose subcellular localization was changed by TNMs. We found that 110 membrane-associated or cell polarity-related proteins changed subcellular localization in the presence of TNMs. Approximately 30 of these proteins were localized and accumulated at sites with thick cell wall, including those related to cytoskeleton formation and intracellular membrane trafficking. In this presentation, we report the proteins whose localization was affected by TNMs, and discuss their potential as cell polarity-related factors.

sterol, cell polarity, cell wall

発表責任者：中尾拳典（ken10hawkseye@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3G05-08
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 11:00～ ミーティングルーム G

青ジソに含まれるアミロイドβ42 の凝集阻害物質・DDC の代謝物の合成と活性

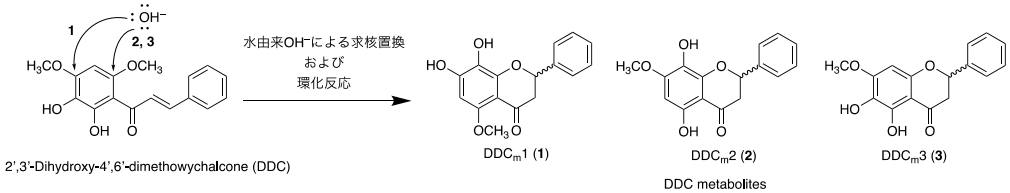
Synthesis of metabolites of DDC that inhibits amyloid ß42 aggregation and thier activities

○谷輪 厚太、村上 一馬、坂口 嘉紀、入江 一浩（京大農）
○Kota TANIWA, Kazuma MURAKAMI, Yoshiki SAKAGUCHI, Kazuhiro IRIE (Kyoto Univ.)

アルツハイマー病の原因物質である 42 残基のアミロイドβ (Aβ42) は，主として分子間βシート構造をとることにより凝集（オリゴマー化）し，神経細胞毒性を示す．これより，Aβ42 の凝集を抑える食品や漢方薬に含まれる機能性成分は，疾患予防に有効と考えられる．赤池と久米ら（京大院薬）は 2',3'-dihydroxy-4',6'-dimethoxychalcone（DDC）を青ジソの抽出液から単離・同定し，[1] DDC の Aβ42 凝集阻害活性を報告した.[2]　2018 年度の本大会で，演者らのグループは DDC が Aβ42 のオリゴマー化を阻害すること，MS/MS 測定に基づいた Flavonoid search（かずさ DNA 研）から DDC のオリゴマー形成阻害に必要な活性代謝物の存在を報告した.[3] 本研究では，水酸化物イオンによる求核置換反応，それに続くカルコンの環化よる生成が推定された 3 つの酸化体 DDCm1~3 (**1** ~ **3**) を合成した．これらの Aβ42 凝集阻害活性をチオフラビン T 蛍光法で調べた結果，5, 6 位にカテコール構造をもつ **3** が最も強い阻害活性を示し，DDC 中の **3** の存在を HPLC で確認した．

The 42-residue amyloid β (Aβ42), which is a causative agent of Alzheimer's disease (AD), aggregates (oligomerizes) and exhibits neurotoxicity. Therefore, taking functional ingredients in foods and herbal medicines that suppress Aβ42 aggregation are beneficial for AD prevention. Akaike and Kume *et al*. reported DDC from the extract of *green perilla* as an aggregation inhibitor of Aβ42. Previously, our group demonstrated that the inhibitory activity of Aβ42 oligomerization by DDC could be associated with oxidative metabolites of DDC, which was proposed based on Flavonoid Search (Kazusa DNA Laboratory) using MS/MS measurement. In this study, three metabolites (**1**~**3**) were synthesized from chrysin (**1**) and 4',6'-dimethoxy-2'-hydroxyacetophenone (**2**, **3**), respectively. In thioflavin T assay, **3** showed the inhibitory activity comparable to DDC, and a small amount of **3** was detected in DDC by HPLC. These results suggest that **3** could be a promising food component for AD treatment.

[1]Izumi, Y. *et al., Free Radic. Biol. Med.* **2012**, *53*, 669
[2]Iwasaki, M. *et al., Biol. Pharm. Bull.* **2019**, *42*, 1942
[3]坂口ら，2018 年度日本農芸化学会本大会（名古屋）2A15a15



aggregation, Alzheimer's disease, flavonoid

発表責任者：村上一馬（murakami.kazuma.4v@kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3G05-09
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 11:00～ ミーティングルーム G

CH/π相互作用に着目した Aplysiatoxin 単純化アナログの分子動力学解析

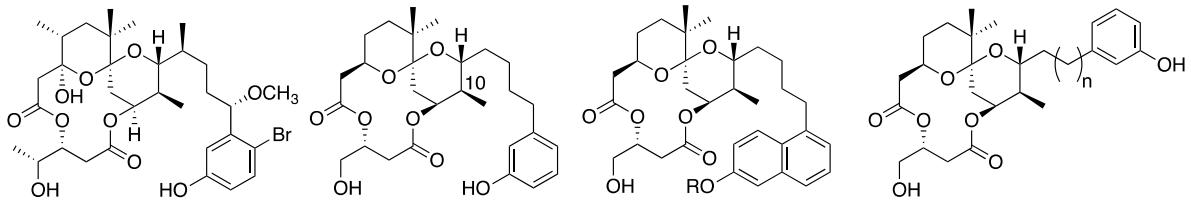
Molecular dynamics analysis of simplified analogs of aplysiatoxin focused on CH/π interaction

○柳田 亮[1]、小林 巧実[2]、権田 敦子[2]、高田 晃児[2]、入江 一浩[2] ([1]香川大農、[2]京大院農)
○Ryo C. YANAGITA[1], Takumi KOBAYASHI[2], Atsuko GONDA[2], Koji TAKADA[2], Kazuhiro IRIE[2]
([1]Kagawa Univ., [2]Kyoto Univ.)

【背景・目的】海洋天然物 aplysiatoxin (ATX) はプロテインキナーゼ C (PKC) を強力に活性化する。我々は、創薬シーズの創出を指向して、ATX の構造単純化アナログである Aplog 類の開発を行ってきた。分子モデリングから Aplog 類の側鎖 phenol 基は PKC との水素結合と CH/π 相互作用の両方に関与していることが示唆されている。この CH/π 相互作用を増強する目的で 10-Me-Aplog-1[1] (**1**) の phenol 基を naphthol 基に拡大したアナログ[2]や側鎖のリンカー長を増減させたアナログが合成された[3]。本研究では、これらの Aplog 類と、PKC、リン脂質二重膜との複合体の分子動力学シミュレーションにより、Aplog 類と PKC との結合様式ならびに CH/π 相互作用について考察した。
【結果・考察】分子動力学シミュレーションでは、naphthol アナログとリンカー長を 2 炭素分減らしたアナログが水素結合と CH/π 相互作用を同時に形成できた。得られたトラジェクトリの MM-PBSA 解析と膜移行エネルギー予測を組み合わせてリガンドの結合自由エネルギー ΔG_{bind} を予測した。予測 ΔG_{bind} は **1** を除いて実験値と良い相関を示した。MM-PBSA 解析ではリガンドおよびタンパク質の結合に伴う配座やエントロピーの変化は考慮されていないため、**1** の相対的な結合能の高さはこれらの要素に起因している可能性がある。

【引用文献】1) Kikumori, M. *et al., J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 5614–5626. 2) Kobayashi, T., *et al., Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2020**, *30*, 127657. 3) Gonda, A. *et al., Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2021**, *85*, in press (DOI: 10.1093/bbb/zbaa024).

Recently, focusing on CH/π interaction, we developed a series of new simplified analogs of natural tumor promoter aplysiatoxin (aplogs). Unfortunately, all of the analogs showed slightly weaker affinity for protein kinase C (PKC) compared to 10-Me-aplog-1. In this study, we performed molecular dynamics (MD) simulation of PKC C1 domain/aplogs complex in the phospholipid bilayer. The MD simulations and subsequent MM-PBSA calculations suggest that the relative high affinity of 10-Me-Aplog-1 could be attributed to smaller potential energy loss in the binding process.



protein kinase C, aplysiatoxin, molecular dynamics simulation

講演番号：3G05-10
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 11:00～ ミーティングルーム G

薬用植物セージからの AhR リガンドの単離・同定

Identification of aryl hydrocarbon receptor ligands from *Salvia officinalis* leaves

○西野 勝俊[1]、染谷 健太[1]、Riadh Ksouri[2]、石川 敏夫[3]、礒田 博子[4,5]、入江 一浩[6]、永尾 雅哉[1]
([1]京大院・生命、[2]CBBC・チュニジア、[3]帝京大・医、[4]筑波大院・生命環境、[5]筑波大・地中海・北アフリカ研究センター、[6]京大院・農)
○Katsutoshi NISHINO[1], Kenta Someya[1], Ksouri Riadh[2], Toshio Ishikawa[3], Hiroko Isoda[4,5], Kazuhiro Irie[6], Masaya Nagao[1] ([1]Grad Sch Biostudies, Kyoto Univ., [2]CBBC・Tunisia, [3]Dept Intern Med, Teikyo Univ., [4]Facul Life and Environ Sci,Univ. Tsukuba, [5]ARENA・Univ. Tsukuba, [6]Grad Sch Agric, Kyoto Univ)

免疫は、我々の生命維持に必須である。近年、免疫に関わる T 細胞の分化に、ダイオキシン受容体として知られる Aryl hydrocarbon receptor (AhR) が関わっていること、さらに AhR は、それを活性化するリガンドの種類によって、ナイーブ $CD4^+$ T 細胞からエフェクターT 細胞 (免疫促進) 、もしくは制御性 T 細胞 (免疫抑制)という機能が異なる細胞への分化に関与することが明らかとなった。そこで我々は、これまでに AhR リガンドとしてフラボノイドが報告されていることから、欧州で古くから薬用植物として知られ、フラボノイドが豊富なセージ (*Salvia officinalis*) から AhR リガンドの単離、同定を試み、それらの T 細胞分化における効果を調べることにした。その結果、セージから AhR リガンドして、フラボノイドではなく、新規を 1 つ含む、7 種のアビエタン型ジテルペンを同定した。続いて、いくつかの単離リガンドが、エフェクターT 細胞である Th17,Th22 細胞および、制御性 T 細胞への分化制御に関与するか調べた。その結果、各細胞への分化促進、もしくは抑制効果は、リガンドごとに異なるという、様々な T 細胞分化誘導パターンを示した。

既存の AhR リガンドが、別の免疫細胞である樹状細胞からのサイトカインの分泌や、腸管における感染症へのバリア機能として重要なタイトジャンクションの恒常性維持にも関与していることが示唆されている。このことから、単離した AhR リガンドの、これらに与える影響についての評価を検討中である。

The human immunity is an essential for our survival. In recent years, activation of aryl hydrocarbon receptor (AhR) known as a dioxin receptor has been known to be related to the adaptive immune system, especially the differentiation of naive $CD4^+$ T cells. However, each AhR ligand induces effector T cells (immunopromotion) or regulatory T cells (immunosuppression). Since flavonoids have been reported as AhR ligands, we have tried to isolate and identify AhR ligands from common sage (*Salvia officinalis*), which contains flavonoids. Common sage is known for its medicinal effects since early times in Europe. As a result, seven abietane diterpenoids including one novel compound were identified as AhR ligands. Subsequently, it was investigated whether the isolated ligands are involved in the regulation of differentiation into effector T cells such as Th17 and Th22 cells or regulatory T cells. The ligands had different effects on differentiation into each subpopulations of $CD4^+$ T cells.

It has also been suggested that known AhR ligands regulate the secretion of cytokines from dendritic cells, and homeostasis of tight junction in Caco2 cells. We are considering to investigate the effects of isolated AhR ligands on these functions.

Salvia officinalis, Diterpenoids, Aryl hydrocarbon receptor

講演番号：3G05-11
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 11:00～ ミーティングルーム G

C-メチルフィセチンのラジカル消去活性

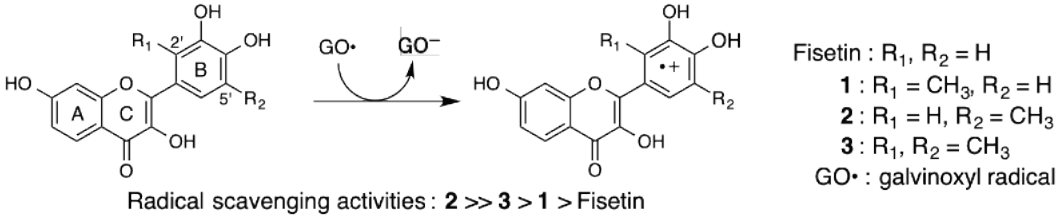
Radical-scavenging activity of C-methylated fisetin analogues

○福原 潔[1]、中西 郁夫[2]、大久保 敬[3]、水野 美麗[1]、松本 謙一郎[2]、大野 彰子[4] ([1]昭和大、[2]放医研、[3]大阪大、[4]国衛研)
○ Kiyoshi FUKUHARA[1], Ikuo NAKANISHI[2], Kei OHKUBO[3], Mirei MIZUNO[1], Kenichiro MATSUMOTO[2], Akiko OHNO[4] ([1]Showa Univ., [2]NIRS, [3]Osaka Univ., [4]NIHS)

本研究では、寿命の延伸作用やアルツハイマー病の予防作用で注目されているフィセチンの高機能化を目指して、カテコール構造のオルト位にメチル基を導入したモノメチル体およびジメチル体を合成し、ラジカル消去活性とそのメカニズムを明らかにした。

メチルカテコールを出発原料とし、Alger-Flynn-Oyamada 反応を用いてフラボノイド骨格を合成後、脱保護してモノメチル体(2'-メチル体:**1**、5'-メチル体:**2**)および 2',5'-ジメチル体(**3**)を得た。これらの化合物について、活性酸素のモデル化合物であるガルビノキシルラジカルに対する反応の速度論的解析を行い、ラジカル消去活性を求めた。その結果、フィセチンはメチル基を導入するとラジカル消去活性が増大し、特に **2** が最も強力な活性を示した。分子軌道計算により最安定化構造を求めたところ、**2** は分子全体の平面性が保たれているが、**1** および **3** は 2'-メチル基の立体障害により AC 環に対して B 環が大きくねじれた構造を示した。強力なラジカル消去作用を有する **2** の O-H 結合の解離エネルギー(BDE)とイオン化ポテンシャル(IP)は、これらの化合物の中でどちらも最小の値を示した。また、これらの化合物のラジカル消去活性は IP と良好な負の相関を示すことから、ラジカル消去反応は一電子還元反応で進行していることが明らかとなった。

以上、フィセチンのカテコール構造のオルト位にメチル基を導入すると強力なラジカル消去作用を示した。平面性の高い **2** はラジカル消去反応の過程で一電子移動反応によって生成するラジカルカチオンが分子全体に非局在化するため、最も強力なラジカル消去活性を示すことが考えられる。



Fisetin derivatives in which methyl substituents were introduced at the ortho positions relative to the catechol hydroxyl groups were synthesized and their radical scavenging activities were evaluated and compared with that of the parent fisetin molecule. Among the methyl derivatives, 5'-methyl fisetin, in which the inherent planar structure of fisetin was retained, exhibited the strongest radical scavenging activity. Introduction of methyl substituents may be effective for the enhancement of various biological activities of antioxidants, particularly radical-scavenging activity.

Flavonoid, Fisetin, Antioxidant

発表責任者：福原　潔（fukuhara@pharm.showa-u.ac.jp）

講演番号：3G05-12
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 11:00～ ミーティングルーム G

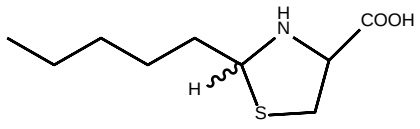
2-ペンチルチアゾリジン-4-カルボン酸とその類縁体の抗菌活性

Antibacterial activity of 2-penthyl thiazolidine-4-carboxylic acid and its analogs

○浮岡 希良々、野下 浩二（秋田県立大学）
○Kirara UKIOKA, Koji NOGE (Akita Pref. Univ.)

アルデヒドと L-cysteine を反応させると、2 位にアルキル側鎖が導入されたチアゾリジン化合物を合成することができる。2-アルキルチアゾリジン-4-カルボン酸が界面活性剤として働くと予想されることから、本化合物の新規な活性の探索として抗菌活性評価を試みた。まず、hexanal と L-cysteine から 2-pentyl thiazolidine-4-carboxylic acid (1) を合成し、その抗菌活性を評価したところ、野外から採集したグラム陽性細菌 (*Bacillus* sp.、*Staphylococcus* sp.) ならびに陰性細菌 (*Pseudomonas* sp.、*Rhizobium* sp.) に対して抗菌作用を示すことが確認できた。次に、構造と活性の関係を調べることを目的に、カルボン酸をメチルエステル化すると、*Staphylococcus* sp. に対する抗菌活性は失われたが、他の 3 種の細菌に対しては (1) よりも強い抗菌活性を示した。さらに、アルキル側鎖の長さを変えた類縁化合物の抗菌活性についても合わせて報告する。

2-Alkyl thiazolidines can be synthesized from aldehydes and L-cysteine. It was predicted that 2-alkylthiazolidine-4-carboxylic acids act as a surfactant, thus we planned to evaluate their antibacterial activity as a search for a novel activity. First, we synthesized 2-pentyl thiazolidine-4-carboxylic acid (1) from hexanal and L-cysteine, which showed antibacterial activity against Gram-positive (*Bacillus* sp. and *Staphylococcus* sp.) and negative bacteria (*Pseudomonas* sp. and *Rhizobium* sp.) collected from the field. Next, to investigate the relationship between structure and activity, 2-pentyl thiazolidine-4-carboxylic acid was converted to its methyl ester. The methyl ester did not show the antibacterial activity against *Staphylococcus* sp., while it showed higher activity against the other three bacteria than compound (1). We will also report the antibacterial activity of their analogs with different lengths of alkyl chain.



2-Pentyl thiazolidine-4-cardoxylic acid (1)

thiazolidine, saturated aldehyde, cysteine

発表責任者：野下浩二（noge@akita-pu.ac.jp）

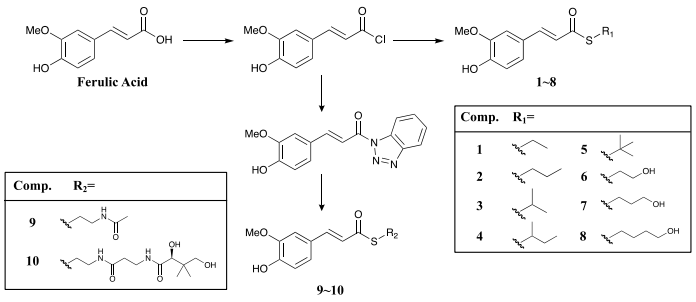
講演番号：3G05-13
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 11:00～ ミーティングルーム G

クマリン骨格形成鍵酵素の基質認識における構造活性相関

Structure-activity relationship study in the substrate recognition of the ortho-hydroxylase, a key enzyme in coumarin formation in plants.

○関口 茉樹、清水 文一（東洋大院生命）
○Maki SEKIGUCHI, Bun-ichi SHIMIZU (Toyo Univ.)

植物は二次代謝により、非常に多様な構造を持つ化合物を産生する。二次代謝産物の一種であるクマリン化合物は植物界に広く分布しており、植物での生合成はフェニルプロパノイド経路上の各種桂皮酸類縁体の芳香環のオルト位に水酸基が導入され、各ステップを経て生成される。シロイヌナズナでは、クマリン化合物の一種である Scopoletin が蓄積するが、その生合成では 2-オキソグルタル酸依存性ジオキシゲナーゼ (2OGD) ファミリーに属する Feruloyl-CoA 6’-hydroxylase (F6’H1) がオルト位水酸化を触媒している。F6’H1 はその基質として Feruloyl-CoA のみを認識し、遊離の Ferulic Acid を基質としない。その一方で、本酵素の X 線構造解析が報告されているが、CoA チオエステル部分の基質認識に関しては全く不明である。



本研究では F6’H1 の CoA チオエステル構造の選択性に着目し、Feruloyl-CoA をミミックした Feruloyl チオエステル誘導体(**1~10**)の有機合成を行い、F6’H1 基質認識における CoA チオエステル部分に関する構造活性相関を検討した。

Plant secondary metabolism produces various compounds with a large diversity in their structures. According to the substitution patterns of hydroxycoumarins and their C6–C3 structure, the respective cinnamate units are subjected to *ortho*-hydroxylation of the aromatic ring, *trans/cis* isomerization of the side chain, and lactonization during coumarin formation. *Ortho*-hydroxylation step is an irreversible step; therefore, it is thought to be the key step in coumarin formation. In Arabidopsis, feruloyl-CoA 6'-hydroxylase (F6'H1), an 2-oxogultarate-dependent dioxygenase (2OGD), catalyzes the *Ortho*-hydroxylation step in the biosynthesis of scopoletin. F6'H1 recognize only feruloyl-CoA as its substrate, and does not use free ferulic acid as a substrate. X-ray structural analysis of this enzyme has been reported, whereas the substrate enzyme complex of the CoA thioester has not been crystallized, therefore recognition of the CoA moiety is still unclear. In this study, we focus on the substrate selectivity of F6’H1 to CoA thioester. For this purpose, we synthesis a series of feruloyl thioesters mimicking feruloyl-CoA to analyze the structure-activity relationship between F6’H1 and the substrates.

Substrate recognition, Plant secondary metabolism, *Ortho*-hydroxylase

講演番号：3G05-14
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 11:00～ ミーティングルーム G

ネオエキヌリン B とその誘導体の合成と抗ウイルス活性

Synthesis and Antivirus Effects of Neoechinulin B and Its Derivatives

○西内 宏太[1]、大橋 啓史[1,2]、古田 将照[1]、増子 巧[1]、大金 賢司[1]、紙透 伸治[3]、渡士 幸一[1,2]、倉持 幸司[1] ([1]東理大・理工、[2]感染研ウイルス第二部、[3]麻布大・獣医)
○Kota NISHIUCHI[1], Hirofumi OHASHI[1,2], Masateru FURUTA[1], Takumi MASHIKO[1], Kenji OHGANE[1], Shinji KAMISUKI[3], Koichi WATASHI[1,2], Kouji KURAMOCHI[1] ([1]Tokyo Univ. of Science, [2]National Institute of Infectious Diseases, [3]Azabu Univ.)

我々は真菌 *Eurotium rubrum* Hiji025 からインドールアルカロイドである neoechinulin B (Neo B, **Figure 1**) を単離した。Neo B は肝臓 X 受容体 (LXR) に対してアンタゴニストとして働き、その下流にある脂質合成酵素の転写を阻害し、C 型肝炎ウイルス (HCV) の増殖場である脂肪滴の過剰発生を抑制する。そのため、Neo B は C 型肝炎治療薬リード化合物として期待されている。本研究では Neo B を誘導体展開することで、より強力な抗 HCV 活性を示す化合物を見出すことを目標とした。

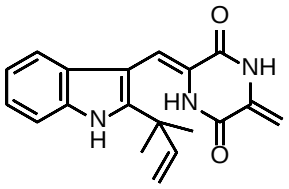
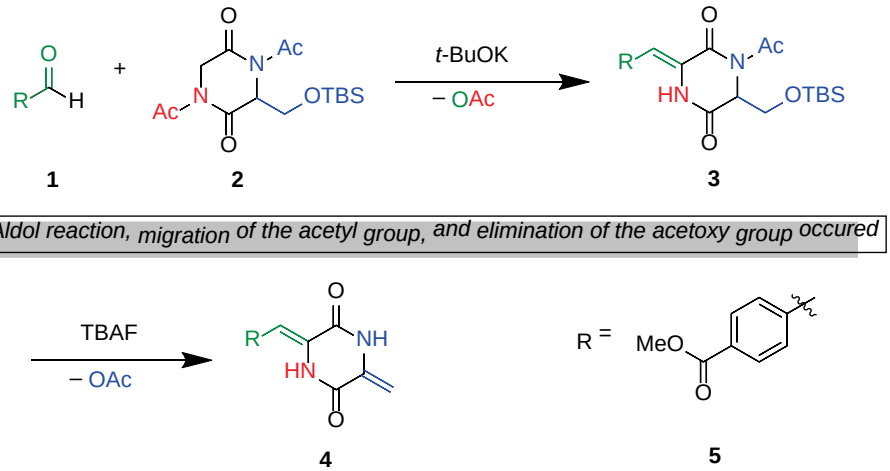


Figure 1. Neo B の構造

今回、アルデヒドとジケトピペラジンを基質に用い、二つのカスケード反応を組み合わせることで、わずか二段階での Neo B の母核の構築に成功した (**Scheme 1**)。そしてこの合成法により Neo B と 16 種の Neo B 誘導体の合成を達成した。さらに合成した 16 種の Neo B 誘導体を用いて、HCV と新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) に対するアッセイを行ったところ、どちらに対しても高い活性を示す化合物 **5** を見出した。



Scheme 1. Neo B と誘導体の合成

Our group identified that neoechinulin B (Neo B), isolated from *Eurotium rubrum* Hiji025, exhibited the antiviral effects against hepatitis C virus (HCV) (**Figure 1**). This compound inhibited the induction of the liver X receptor (LXR)-regulated genes and altered lipid metabolism. In this study, we established the synthesis of Neo B and its derivatives (**Scheme 1**). Furthermore, we identified that compound **5** showed anti-HCV and anti-SARS-CoV-2 activities without serious cytotoxicity against host cells.

neoechinulin B, LXR antagonist, anti-HCV and anti-SARS-CoV-2 activities

講演番号：3G05-15
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 11:00～ ミーティングルーム G

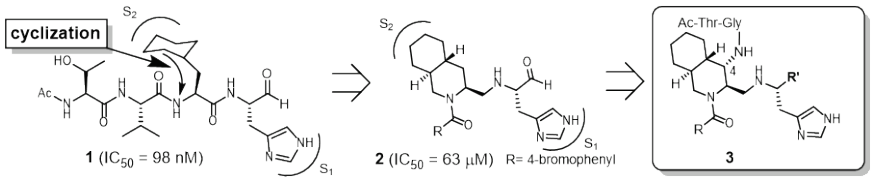
新規相互作用部位を付与したアザ-デカリン型 SARS 3CL プロテアーゼ阻害剤の合成と評価

Evaluation of an additional substituent to the aza-decalin type SARS 3CL protease inhibitor

○服部 恭尚[1]、大西 康司[2]、三谷 勇人[2]、小林 数也[2]、赤路 健一[2] ([1]京都薬大共同機器セ、[2]京都薬大薬品化学)

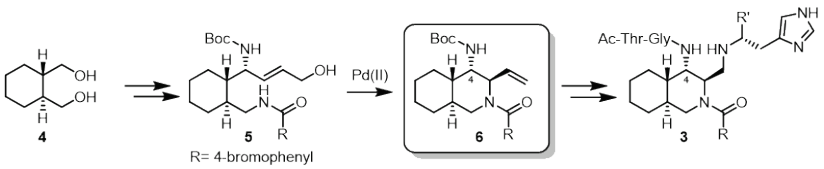
○Yasunao Hattori[1], Kouji Ohnishi[2], Hayato Mitani[2], Kazuya Kobayashi[2], Kenichi Akaji[2] ([1]Kyoto Pharm. Univ. Center for Instrumental Analysis, [2]Kyoto Pharm. Univ. Department of Medicinal Chemistry)

【目的】重症急性呼吸器症候群 (severe acute respiratory syndrome、SARS) は、21 世紀初の新興感染症であり新種のコロナウィルス (SARS-CoV-1) が発症の原因である。昨年より流行を繰り返している Covid-19 の原因ウイルスは同種の SARS-CoV-2 であり、ワクチンの開発は進んでいるものの未だ有効な治療薬は開発されていない。SARS CoV の増殖には SARS 3CL プロテアーゼ (SARS 3CL^{pro}) が必須であり、本酵素の配列および立体構造は両ウイルスで酷似している。従って、SARS 3CL^{pro} 阻害剤は有望な抗 SARS 薬の標的となりうる。



我々はこれまでの研究で、基質配列に基づくペプチドアルデヒド型阻害剤 **1** の S2 ポケットでの疎水性相互作用に着目した低分子型阻害剤 **2** を報告している。本発表では、新たに開発したアザ-デカリン型阻害剤 **3** の合成と阻害活性評価を行ったので報告する。

【方法・結果】市販のジオール **4** から数工程でアザ-デカリン 4 位に相当する位置に置換基を持つ環化前駆体 **5** を合成し、二価パラジウム触媒を用いた環化反応により 2 環性縮環構造を有する鍵中間体 **6** を構築した。最後に新規相互作用部位と P1 サイトにあたる種々のヒスチジン誘導体を導入することで、標的化合物群 **3** の合成を達成しそれぞれの化合物について阻害活性評価を行った。



Severe acute respiratory syndrome (SARS) is caused by a new coronavirus (SARS-CoV-1). In 2019, an outbreak of Covid-19 occurred and its causative virus was identified as the related corona virus named SARS-CoV-2. The key enzyme in the proliferation of the viruses is a chymotrypsin-like protease (SARS 3CL^{pro}). Because of its functional importance in the viral life cycle, SARS 3CL^{pro} inhibitor is considered as an attractive target for the drugs against SARS and Covid-19.

Based on our previous studies on small molecule inhibitors derived from a peptide type inhibitor, the design and evaluation of a novel small molecule type SARS 3CL^{pro} inhibitors will be discussed.

SARS 3CL protease, inhibitor, aza-decalin

講演番号：3G06-01
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:00～ ミーティングルーム G

Bifidobacterium 属細菌のムチン型糖鎖資化経路の解明
Mucin *O*-glycan assimilation pathway in *Bifidobacterium*

○崔 文鶴[1]、後藤 愛那[1]、阪中 幹祥[1]、加藤 紀彦[1]、西本 完[2]、杉山 友太[3]、栗原 新[4]、吹谷 智[5]、横田 篤[5]、北岡 本光[6]、片山 高嶺[1] ([1]京大院・生命、[2]農研機構・食品研、[3]京大院・農、[4]近畿大・生物理工、[5]北大院・農、[6]新潟大・農)
○ Moonhak CHOI[1], Aina GOTOH[1], Mikiyasu SAKANAKA[1], Toshihiko KATOH[1], Mamoru NISHIMOTO[2], Yuta SUGIYAMA[3], Shin KURIHARA[4], Satoru FUKIYA[5], Atsushi YOKOTA[5], Motomitsu KITAOKA[6], Takane KATAYAMA[1] ([1]Grad. Sch. Biostud., Kyoto Univ., [2]NARO, [3]Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [4]Kindai Univ., [5]Hokkaido Univ., [6]Niigata Univ.)

ビフィズス菌は、ヒトの腸管に生息する偏性嫌気性細菌で、いわゆるプロバイオティクスとして知られている。我々は、ビフィズス菌が腸管上皮から分泌されるムチン糖タンパク質の糖鎖やその分解物を資化するための特異的な経路を有していることを明らかとしてきた。ビフィズス菌は、細胞外酵素エンド-α-*N*-アセチルガラクトサミニダーゼによってムチン型糖鎖コア-1 構造から遊離されたガラクト-*N*-ビオース(GNB; Galβ1-3GalNAc)を、特異的トランスポーター(GltABC)を利用して取り込む。細胞内に取り込まれた GNB は、β-1,3-ガラクトシル-*N*-アセチルヘキソサミンホスホリラーゼ(GLNBP)によって α-ガラクトース-1-リン酸(α-Gal-1-P)と *N*-アセチルガラクトサミン(GalNAc)に分解され、生じた α-Gal-1-P はルロワール経路によって α-Glc-1-P に変換された後、解糖系に入る。しかしながら、もう一方の GalNAc がどのようにして代謝されるかについては、全ゲノム配列が決定された後でも明らかとなっていなかった。

本研究では、GalNAc が *N*-アセチルグルコサミン(GlcNAc)を中間体としてフルクトース-6-リン酸(Fru-6-P)に至る経路の可能性について検証した。

Bifidobacterium is an obligate anaerobic bacterium that inhabits the human intestines and is known as so-called probiotics. We have shown that bifidobacteria have a specific pathway for assimilating sugar chains of mucin glycoproteins secreted from the intestinal epithelium. Galacto-*N*-biose (GNB; Galβ1-3GalNAc), which is released from the mucin-type core-1 structure (T-antigen) by the action of extracellular endo-α-*N*-acetylgalactosaminidase, is internalized by a specific ABC transporter GltABC. The imported GNB is phosphorolyzed by β-1,3-galactosyl-*N*-acetylhexosamine phosphorylase (GLNBP) to produce α-galactose-1-phosphate (α-Gal-1-P) and *N*-acetylgalactosamine (GalNAc). α-Gal-1-P is converted to α-Glc-1-P by the Leloir pathway and then enters bifidobacteria-specific glycolysis. However, how bifidobacteria assimilate GalNAc has remained elusive even after the genome sequence has been determined.

In this study, we examined the possible pathway for conversion of GalNAc to fructose-6-phosphate (Fru-6-P) via *N*-acetylglucosamine (GlcNAc) as an intermediate.

Bifidobacterium, Mucin, Galacto-*N*-biose

発表責任者：片山高嶺（takane@lif.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3G06-02
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:00～ ミーティングルーム G

ヒト腸内細菌 *Phocaeicola plebeius* のキシラナーゼの発現解析
Expression analysis of xylanase from human gut bacteria *Phocaeicola plebeius*

○辻 省吾[1]、髙木 千尋[1]、林 秀謙[1,2] ([1]前工大院、[2]前工大工工)
○ Shogo TSUJI[1], Chihiro TAKAGI[1], Hidenori HAYASHI[1,2] ([1]Grad. Maebashi institute of technology, [2]Maebashi institute of technology)

【目的】日本人の糞便より単離された *Phocaeicola plebeius* (*Bacteroides plebeius*) をキシランで培養し、活性染色により解析したところ、複数のキシラナーゼが発現していた。また、ゲノム DNA には、ファミリー10 に属する 2 つの *xyn10A* と *xyn10B* 遺伝子が存在していた。本研究では、二つのキシラナーゼおよび、キシラン資化関連遺伝子の炭素源の違いによる発現解析を行った。【方法】Oat-spelt xylan(OSX)、Beechwood xylan(BWX)、キシロース、グルコースおよびセロビオースで培養を行い、定量 PCR により、2 つのキシラナーゼ遺伝子を含む PUL17 の遺伝子発現を解析を行なった。さらに、活性染色よりキラナーゼの発現解析を行った。【結果及び考察】PUL17 の遺伝子群について定量 PCR を行ったところ、キシラン培養時に遺伝子の発現量が高かった。*xyn10B* 周辺の遺伝子は対数期中期で高く発現し、*xyn10A* 周辺遺伝子では対数期後期で高い発現量を示した。PUL17 には複数の Sus ホモログ遺伝子やキシラン分解に関連する糖質加水分解酵素が存在する。一方、グルコース培養時は PUL17 の遺伝子群は発現量は低下した。活性染色を行ったところ、OSX と BWX 培養時に約 45 kDa と約 80 kDa の強いキシラナーゼ活性のあるバンドが検出した。一方、セロビオース培養時では活性の弱いバンド、グルコースとキシロース培養時は非常に活性が弱いバンドを検出した。以上より、PUL17 の遺伝子群はキシラン培養時に発現が促進されことが判明した。

Phocaeicola plebeius (*Bacteroides plebeius*) isolated from Japanese feces was cultured in xylan and analyzed by zymogram. As a result, some xylanases were expressed. In addition, two *xyn10A* and *xyn10B* genes belonging to GH family 10 were present in genomic DNA. In this study, we analyzed the expression of two xylanases and their related genes due to differences in carbon sources during culture. *P. plebeius* was cultured in Oat-spelt xylan (OSX), Beechwood xylan (BWX), xylose, glucose and cellobiose, and the genes expression of PUL17 containing two xylanase genes were analyzed by RT-qPCR. The expression level of these genes were high in xylan culture. The genes around *xyn10B* were highly expressed in the middle logarithmic phase. On the another hand, the genes around *xyn10A* were expressed in the late logarithmic phase. Zymogram analysis revealed that this strain has a strong xylanase active band of about 45 kDa and 80 kDa in OSX and BWX cultures.On the another hand, weak bands wwere detected in cellobiose culture. The bands with very weak xylanase activity were detected in glucose and xylose cultures. In other words, the expression of PUL17 genes group were promoted in xylan culture.

xylanase, *Phocaeicola plebeius*, RT-qPCR

発表責任者：辻省吾（m2066008@maebashi-it.ac.jp）

講演番号：3G06-03
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:00～ ミーティングルーム G

RuBisCO 経路を利用した組換え大腸菌によるポリヒドロキシアルカン酸の合成と RuBisCO 評価系への応用

Biosynthesis of polyhydroxyalkanoate using RuBisCO pathway and its application to evaluation of RuBisCO

○藤原 悠暉[1]、齋藤 樹理[1]、永田 暁洋[1]、大潟 祥梧[1]、二宮 太樹[2]、谷口 遼[2]、松本 直己[2]、堀 千明[1]、大井 俊彦[1]、蘆田 弘樹[2]、松本 謙一郎[1] ([1]北大院工、[2]神戸大人間発達環境学)
○Haruki FUJIWARA[1], Juri SAITO[1], Akihiro NAGATA[1], Shogo OGATA[1], Taiki NINOMIYA[2], Ryo TANIGUCHI[2], Naoki MATSUMOTO[2], Chiaki HORI[1], Toshihiko OOI[1], Hiroki ASHIDA[2], Ken'ichiro MATSUMOTO[1] ([1]Hokkaido Univ., [2]Kobe Univ.)

Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase（RuBisCO）とグリコール酸(GL)重合活性を有する改変型ポリヒドロキシアルカン酸(PHA)重合酵素遺伝子を導入した大腸菌を用いて、P(GL-*co*-3-hydroxybutyrate)が合成できる。本ポリマーの合成量および組成を分析することにより、RuBisCO 活性とオキシゲナーゼ反応の反応量を推定することを試みた。*Rhodospirillum rubrum*、*Thermococcus kodakaraensis*、*Methanosaeta concilli* 由来 RuBisCO 遺伝子がポリマー蓄積量の増大を示し、大腸菌での機能的発現を確認した。特に *R. rubrum* 由来 RuBisCO 遺伝子導入株ではポリマー蓄積と有意な GL ユニットの蓄積が観測され、*R. rubrum* 由来 RuBisCO の高いオキシゲナーゼ活性を反映していると考えられた。一方、他の RuBisCO 導入株においては、ポリマー蓄積量が低く GL が検出されなかった。これらの事から、ポリマー合成効率と RuBisCO 発現条件を両方満たす実験条件を設定することが重要であることが示された。

RuBisCO and engineered polyhydroxyalkanoate synthase with glycolate (GL)-incorporating activity were expressed into *Escherichia coli* to produce poly(GL-co-3-hydroxybutyrate). This study aimed at evaluating the activity and CO_2/O_2 specificity of RuBisCOs based on the accumulation and monomer composition of the polymer. Introduction of the RuBisCO genes from *Rhodospirillum rubrum, Thermococcus kodakaraensis, Methanosaeta concilli* led to the significant polymer production, suggesting their functional expression. In particular, *R. rubrum* RuBisCO-expressing *E. coli* exhibited a high GL fraction that is consistent to its high oxygenase activity. GL fractions in the other RuBisCO conditions were below the detection limit due to the low polymer production.

carbon fixation, substrate specificity, PHA

発表責任者：松本　謙一郎（mken@eng.hokudai.ac.jp）

講演番号：3G06-04
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:00～ ミーティングルーム G

配列制御型ポリヒドロキシアルカン酸合成酵素を用いたランダムホモブロック共重合体グリコール酸ポリマーの生合成

Biosynthesis of random-homo block copolymer poly[glycolate-ran-3-hydroxybutyrate (3HB)]-b-poly(3HB) using sequence-regulating chimeric polyhydroxyalkanoate synthase in Escherichia coli

○柳川 謙吾[1]、荒井 修造[1]、榊原 早也果[1]、Mareschal Robin[2]、大井 俊彦[1]、Zinn Manfred[2]、松本 謙一郎[1] ([1]北大院工、[2]HES-SO Valais-Wallis)
○ Kengo Yanagawa[1], Shuzo Arai[1], Sayaka Sakakibara[1], Robin Mareschal[2], Toshihiko Ooi[1], Manfred Zinn[2], Ken'ichiro Matsumoto[1]
([1]Hokudai Eng, [2]HES-SO Valais-Wallis)

ポリヒドロキシアルカノエート(PHA)の生合成において、前回までに 2-ヒドロキシブタン酸 (2HB) と 3HB のブロック共重合体を合成できるキメラ型改変酵素 $PhaC_{AR}$ を報告している。本研究では、$PhaC_{AR}$ を用いてグリコール酸 (GL) を含む PHA を合成することを試みた。グリコリル(GL)CoA を重合できる重合酵素として報告されていた PhaC1(STQK)をコントロールとして、それぞれの重合酵素を発現する組換え大腸菌でポリマー合成を行った。両条件で同程度の GL を含むポリマーが生産されたことから、$PhaC_{AR}$ は GL 重合活性を有することがわかった。ポリマーの ^{1}H NMR 測定の結果, PhaC1(STQK)によって合成されたポリマーは、PHA 共重合体に一般的に見られるランダム共重合体であったのに対し、$PhaC_{AR}$ によって合成されたポリマーは、GL と 3HB のランダム共重合体からなる P(GL-*ran*-3HB)ランダムセグメントと、ほぼ 3HB のみから構成される P(3HB)ホモポリマーセグメントの２つの領域を含むことが示唆された。2 つのセグメントの存在は、ポリマーの融点の測定と結晶化度の解析からも支持された。以上より、同一分子内にランダム共重合体とホモポリマー構造を両方含む PHA の生合成に初めて成功した。

Polyhydroxyalkanoate (PHA) block copolymer, poly[2-hydroxybutyrate(2HB)-*b*-3HB] was previously synthesized by using the chimeric PHA synthase, $PhaC_{AR}$. The present study aimed at synthesizing glycolate(GL)-incorporated polymer using $PhaC_{AR}$. As the result, P(GL-*co*-3HB) was synthesized by *Escherichia coli* expressing $PhaC_{AR}$. Interestingly, the obtained polymer is a block copolymer composed of P(GL-*ran*-3HB) random segment and P(3HB) homopolymer segment. The conclusion is supported by the thermal properties of the polymer. This is the first report of the block PHA with a random segment.

PHA, Glycolate, biodegradation

発表責任者：松本　謙一郎（mken@eng.hokudai.ac.jp）

講演番号：3G06-05
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:00～ ミーティングルーム G

脱 *N*-アセチル化された両性多糖に特異的な新規多糖リアーゼ

A novel polysaccharide lyase specific for de-*N*-acetylated amphoteric polysaccharide

○武田 穣[1]、宇佐美 亮児[1]、柏原 大輔[1]、近藤 敬子[2]、片平 正人[2]([1]横浜国大工、[2]京大エネ研)
○Minoru Takeda[1], Ryoji Usami[1], Daisuke Kashiwabara[1], Keiko Kondo[2], Masato Katahira[2] ([1]Yokohama Natl. Univ., [2]Kyoto Univ.)

脱離分解で多糖を低分子化する多糖リアーゼ（EC 4.2.2）には、ヒアルロン酸リアーゼ（EC 4.2.2.1）はじめとして 26 種類が知られており、このうちの 5 種類は塩基性多糖に作用する。*N*-アセチルアミノ糖残基とウロン酸残基の間のグリコシド結合を切断するのがそれらの共通の特徴である。これに対して *Paenicabillus koleovorans* 由来の多糖リアーゼ（DssA, AB084782）は、GlcN と GlcA 間の α-1→4 結合を切断（脱 *N*-アセチル状態のアミノ糖残基を認識）する新規多糖リアーゼと考えられるものの、認証には至っていない。DssA の基質は有鞘細菌 *Sphaerotilus natans* の鞘形成高分子（ペプチド系複合糖質）である。今回、近縁種である *S. montanus* の鞘にも DssA が作用することを見出し、DssA の基質特異性の多角的な立証を目指して鞘形成高分子とその DssA 分解物の酵素の構造決定を NMR 測定と質量分析で行った。高分子は部分的に *O*-アセチル化された両性多糖で、その骨格は *S. natans* の鞘形成高分子の多糖部分と同じであり α-GlcN-(1→4)-β-GlcA の部分構造を有していた。分解物は非還元末端に ΔGlcA を非還元末端に GlcN を有する 5 糖と判明した。一方、DssA は化学的に *N*-アセチル化した高分子に対しては微弱な活性しか示さず、α-GlcN-(1→4)-β-Glc の結合を含む脱 *N*-アセチル状態の多糖および複合糖質に特化したリアーゼであることが示された。

To date, 26 types of polysaccharide lyases (EC 4.2.2) have been recognized, and 5 of these are specific for *N*-acetylated amino sugar-containing polysaccharides. A polysaccharide lyase (DssA) secreted by *Paenibacillus koleovorans* cleaves the α-1→4 linkage between GlcN and GlcA in the sheath-forming polymer (glycoconjugate containing peptide) of the sheath-forming bacterium *Sphaerotilus natans*. Although DssA represents a novel category of polysaccharide lyases, its novelty has not been validated. In this work, we found that DssA can act on another sheath-forming polymer originating from *Sphaerotilus montanus*. To obtain additional evidence of its substrate specificity, the structures of the sheath-forming polymer of *S. montanus* and its DssA-digested product were determined. The polymer was revealed to be a partially *O*-acetylated glycan (free of peptide) containing α-GlcN-(1→4)-β-GlcA linkage. Additionally, the digested product was a pentasaccharide containing ΔGlcA and GlcN at the non-reducing and reducing ends, respectively. DssA acted only weakly on the chemically *N*-acetylated sheath-forming polymer. These results demonstrate the of DssA specificity for de-*N*-acetylated polysaccharides and glycoconjugates containing α-GlcN-(1→4)-β-GlcA linkage.

polysaccharide lyase, de-*N*-acetylated polysaccharide, *Paenicabillus koleovorans*

発表責任者：武田 穣（takeda-minoru-bd@ynu.ac.jp）

講演番号：3G06-06
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:00～ ミーティングルーム G

乳酸菌 *Lactobacillus rhamnosus* 由来 L-ラムノース イソメラーゼの発現と構造解析

Expression and X-ray structure analysis of recombinant L-rhamnose isomerase from *Lactobacillus rhamnosus*

○吉田 裕美[1,3]、吉原 明秀[2,3]、倉原 琳[4]、神鳥 成弘[1,3] ([1]香川大・医，総合生命研究セ、[2]香川大・農、[3]香川大・国際希少糖研究教育、[4]香川大・医，自律機能生理学)

○Hiromi YOSHIDA[1,3], Akihide YOSHIHARA[2,3], Lin Hai KURAHARA[4], Shigehiro KAMITORI[1,3] ([1]Life Sci. Res. Center & Fac. Med., Kagawa Univ., [2]Fac. Agric., Kagawa Univ., [3]Int'l Inst. Rare Sugar Res. and Educ., Kagawa Univ., [4]Dept. Cardiovascular Physiol., Fac. Med., Kagawa Univ.)

近年、母乳（初乳）から単離された乳酸菌 *Lactobacillus rhamnosus* Probio-M9(*L. rhamnosus* M9)株はプロバイオティクスとみなされ、*L. rhamnosus* M9 株の投与によって、炎症性腸疾患関連の発癌を抑える働きも見出されている。本研究では、*L. rhamnosus* M9 株のゲノム情報から推定された L-ラムノースイソメラーゼを発現させ、乳酸菌由来 L-ラムノースイソメラーゼとして初めて構造解析を行ったので報告する。

Lactobacillus rhamnosus Probio-M9 (*L. rhamnosus* M9) was isolated from human colostrum and was reported as a potential probiotic lactic acid bacterium. Recently, Kurahara *et al*. found that *L. rhamnosus* M9 exhibited therapeutic effect on colitis associated tumor genesis, thereby the genome information of the strain is useful for screening of valuable enzymes. In our group, we have studied on crystal structure analysis of L-rhamnose isomerase from *Pseudomonas stutzeri*, that is able to catalyze the isomerization not only between L-rhamnose and L-rhamnulose but also between rare sugars D-allose and D-allulose. D-allose is known as to have a repression effect of tumor cell proliferation, and L-rhamnose isomerase is one of the potential enzymes for D-allose production. According to the genome analysis of *L. rhamnosus* M9, a putative L-rhamnose isomerase was found. In this study, a putative L-rhamnose isomerase from *L. rhamnosus* M9 (LrLRhI) was expressed as recombinant enzyme and X-ray structure analysis of LrLRhI was carried out.

The putative LrLRhI was expressed as C-terminal His-tagged protein and purified by affinity chromatography. The purified protein showed enzymatic activities toward L-rhamnose, L-lyxose, D-ribose, L-mannose and D-allose. In crystallization study, some crystals were obtained in several conditions, and used for data collection at Photon Factory AR-NW12A (Tsukuba).

The first crystal structure of L-rhamnose isomerase from *Lactobacillus* sp. was determined and refined at 1.9 Å. LrLRhI forms homo tetramer and its overall structure is similar to known structures of L-rhamnose isomerases from *E. coli*, *Bacillus halodurans*, *Pseudomonas stutzeri*, with amino acid identity of 51, 52, and 23 %, respectively. In the structure of LrLRhI, the electron density maps of loop region that approaches active site are missing. It was supposed that the loop region of LrLRhI is very flexible and related with substrate recognition.

L-rhamnose isomerase, Lactobacillus rhamnosus, X-ray structure

発表責任者：Hiromi Yoshida（h.yoshi@med.kagawa-u.ac.jp）

講演番号:3G06-07
質疑応答日時、会場:3 月 20 日 13:00～ ミーティングルーム G

L-ラムノース代謝経路に関与する L-2-ケト-3-デオキシラムノン酸アルドラーゼの立体選択性の構造基盤の解明

Structural basis for stereoselectivity of L-2-keto-3-deoxyrhamnonate aldolase involved in L-rhamnose metabolism

○福原 将太[1]、渡辺 誠也[1,2]、渡邊 康紀[1,3]([1]愛媛大農、[2]愛媛大沿岸環境科研セ、[3]山形大理)
○Shota FUKUHARA[1], Seiya WATANABE[1,2], Yasunori WATANABE[1,3] ([1]Ehime Univ., [2]Ehime Univ.CMES, [3]Yamagata Univ.)

【背景・目的】L-2-ケト-3-デオキシラムノン酸（L-KDR）アルドラーゼは、酵母 *Scheffersomyces stipitis* の持つリン酸化を伴わないユニークな L-ラムノース代謝経路の 4 番目の酵素（LRA4）として、L-KDR を L-ラクトアルデヒドとピルビン酸にアルドール開裂する反応を触媒する。本酵素は、リシン残基（Lys171）が基質の α-ケト基とシッフ塩基を形成するクラス I アルドラーゼに属する。アルドール縮合反応で D-グリセルアルデヒドを用いた場合、ピルビン酸のメチレン基がアルデヒドのカルボニル炭素の *Si* 面あるいは *Re* 面からの求核攻撃によって、D-2-keto-3-deoxygalactonate（D-KDGal）と D-2-keto-3-deoxygluconate（D-KDGlu）の 2 種類の C4 ジアステレオマーが生成する。D-KDGal : D-KDGlu 比を比較すると、野生型酵素では 83 : 17 であるのに対し、S173T 変異体では 15 : 85 と完全に逆転することがすでに分かっている（Watanabe. *J. Biol. Chem.* 2020, 295, 1338-1349）。このような性質の分子基盤を解明するため、X 線結晶構造解析を行うことにした。
【方法・結果】大腸菌を宿主として発現させ精製し結晶化した LRA4 は、SPring-8 で X 線回折データを収集し、分子置換法により構造を決定した。全体構造は、同じ DHDPS/NAL タンパク質ファミリーの酵素とよく似ていた。続いて、野生型は結晶中でピルビン酸と D-グリセルアルデヒドを縮合させることで、S173T 変異体は共結晶化することで、それぞれの D-KDGal 複合体構造を決定した。D-KDGal の C4-OH と 173 番目の残基間の相互作用の有無により、それぞれ酵素の立体選択性をうまく説明することができた。

L-2-Keto-3-deoxyrhamnonate (L-KDR) aldolase catalyzes the aldol cleavage reaction of L-KDR to pyruvate and L-lactaldehyde in non-phosphorylative pathway of L-rhamnose metabolism from *Scheffersomyces stipitis*. In the putative catalytic mechanism, the ω-amino functionality of Lys171 forms a Schiff base with the carbonyl C2 of α-keto group of substrate (D-glyceraldehyde), which tautomerizes to afford an enamine intermediate that may attack the (*Re*)- or (*Si*)-face of the carbonyl of aldehyde; D-KDGlu and D-KDGal are yielded as two C4-diastereomers. It is reported that the ratio of D-KDGal to D-KDGlu of wild-type and S173T mutant enzymes are 83:17 and 15:85, respectively. Therefore, to elucidate these properties at atomic level, we determined the crystal structures of LRA4 by molecular replacement method. The overall folding was similar to those of the same DHDPS/NAL protein superfamily. In complex with D-KDGal, Ser173 in the wild-type enzyme favorably interacts with C4-OH group of D-KDGal, but Thr173 not, by which can explain their stereoselectivities.

L-Rhamnose, aldolase, stereoselectivity

講演番号：3G06-08
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:00～ ミーティングルーム G

Catenulispora acidiphila 由来α-グルコシダーゼのβ→αループの置換による基質特異性と糖転移活性の改変
Modulation of substrate specificity and transglucosylation activity of *Catenulispora acidiphila* α-glucosidase through substitution of the β→α loops
○佐分利 亘、森 春英（北大院農）
○Wataru SABURI, Haruhide Mori (Hokkaido Univ.)

【背景・目的】α-グルコシダーゼは，α-グルコシドを加水分解して α-グルコースを生じる．糖質加水分解酵素ファミリー13 サブファミリー30 (GH13_30) に分類される *C. acidiphila* 由来 α-グルコシダーゼ Caci_6968 は，α1-6 結合に特異的に作用する酵素であり，高い糖転移活性を示す．本研究では，Caci_6968 の基質特異性や糖転移活性に重要な構造を明らかにすることを目的とした．
【結果・考察】Caci_6968 は，*Arthrobacter globiformis* 由来 α-グルコシダーゼ CmmB と高い配列一致度を示すが，CmmB は α1-4 結合に特異的である．Caci_6968 と CmmB では，触媒$(\beta/\alpha)_8$ バレルの β→α ループ 4 と β→α ループ 7 の配列が特に異なる. Caci_6968 の β→α ループ 4 と β→α ループ 7 を CmmB と置換した変異酵素はイソマルトースに対して野生型酵素より著しく低い k_{cat}/K_m を示したが，β→α ループ 7 変異酵素はマルトースも加水分解した．すなわち，β→α ループ 7 は Caci_6968 と CmmB の基質特異性の決定に重要と考えられた．β→α ループ 4 変異酵素は *p*-ニトロフェニル α-グルコシドに対して反応初期では糖転移を専ら触媒した．8 mM 同基質に対する反応では，β→α ループ 4 置換変異酵素と野生型酵素の転移産物の最大収率はそれぞれ 71%と 41%であった．

【Introduction】α-Glucosidase hydrolyzes α-glucoside to produce α-glucose. α-Glucosidase from *C. acidiphila* (Caci_6968) is specific to α1-6 glucosidic linkage and shows high transglucosylation activity. In this study, important structural elements of Caci_6968 for substrate specificity and transglucosylation activity were investigated.
【Results and discussion】Caci_6968 shows high sequence identity with *Arthrobacter globiformis* α-glucosidase CmmB, which is specific to α1-4 glucosidic linkage. β→α Loops 4 and 7 of Caci_6968 were substituted with corresponding loops of CmmB. Both the Caci_6968 mutants showed significantly lower k_{cat}/K_m for isomaltose, but β→α loop 7 mutated Caci_6968 also hydrolyzed maltose. This indicates that β→α loop 7 is an important structural element to determine the substrate specificity of Caci_6968 and CmmB. β→α Loop 4 mutated Caci_6968 predominantly catalyzed the transglucosylation in the initial reaction with *p*-nitrophenyl α-glucoside. β→α Loop 4 mutant and the wild type produced the transglucosylation product from 8 mM of this substrate with the maximum yield 71% and 41%, respectively.

alpha-glucosidase, substrate specificity, transglycosylation

発表責任者：佐分利 亘（saburiw@chem.agr.hokudai.ac.jp）

講演番号：3G06-09
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:00～ ミーティングルーム G

Aspergillus sojae α-グルコシダーゼ AsojAgdL の立体構造解析

Crystal structure analysis of *Aspergillus sojae* α-glucosidase AsojAgdL

○宮坂 祐希[1]、大八木 彩子[1]、西河 淳[1]、松本 雄治[2]、安武 望[2]、殿塚 隆史[1]([1]東京農工大学院農、[2]昭和産業(株)基盤技術研)
○ Yuki MIYASAKA[1], Ayako OYAGI[1], Atsushi NISHIKAWA[1], Yuji MATSUMOTO[2], Nozomu YASUTAKE[2], Takashi TONOZUKA[1] ([1]School of Agriculture, Tokyo University of Agriculture and Technology, [2]RD&E Center, Showa Sangyo Co., Ltd.)

【目的】*Aspergillus sojae* 由来の糖質加水分解酵素ファミリーGH31 に属するα-グルコシダーゼ（AsojAgdL）は高い糖転移活性を持ち、α-1,6-グルコシド結合を有するオリゴ糖を生成させる性質を示す。AsojAgdL は 950 アミノ酸残基から成り、成熟の過程で約 500 アミノ酸残基付近の配列がプロテアーゼによりプロセシングを受け、二つのポリペプチドから成る複合体として機能する。プロセシングを受ける箇所の前後約 450 番目から 550 番目に至る配列は、立体構造予測では妥当な配列を得ることができなかった。我々はこれまでに、本酵素の *Pichia pastoris* による発現系を構築し結晶を得ておりおおまかな構造を決定している。今回、立体構造のリファインメントを行ったので報告する。

【方法と結果】*P. pastoris* から得られた酵素を Ni-NTA カラムを用いたアフィニティークロマトグラフィーで精製し、Endo Hf によって糖鎖を切断した後、結晶化した。全体構造は他の GH31 と同様、N 末端側のドメイン、$(\beta/\alpha)_8$バレルから成る触媒ドメイン、Proximal C ドメイン、Distal C ドメインから構成されている。立体構造予測ができない約 100 アミノ酸残基については、N 末端側のポリペプチドは 495 番目までの残基、C 末端側のポリペプチドは 519 番目以降の残基より電子密度を確認することができた。N 末端側のポリペプチドの末端 Val495 と C 末端側のポリペプチドの先端 Asn519 は 50 Å以上離れており、この間の配列はプロテアーゼで切断されたものと考えられた。

Aspergillus sojae α-glucosidase AsojAgdL, belonging to glycoside hydrolase family GH31, catalyzes α-1,6-transglucosylation to produce oligosaccharides efficiently. AsojAgdL is composed of 950 amino acid residues. AsojAgdL is proteolytically cleaved during the maturation and the enzyme functions as a complex of two polypeptide chains. We have previously obtained a crystal of AsojAgdL, and here we analyzed the crystal structure of AsojAgdL. AsojAgdL was expressed in *Pichia pastoris*, and the enzyme was purified. *N*-glycans were cleaved using Endo Hf and crystallized. AsojAgdL is composed of N-terminal domain, catalytic $(\beta/\alpha)_8$ barrel domain, proximal C-domain, and distal C-domain, as observed in other GH31 enzymes.

GH31, α-glucosidase, transglucosylation

講演番号：3G06-10
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:00～ ミーティングルーム G

麹菌の細胞壁α-1,3-グルカン生合成に関与するα-アミラーゼ AgtA の特性解析
Analysis of the enzymatic property of α-amylase, AgtA, involved in biosynthesis of cell wall α-1,3-glucan in *Aspergillus oryzae*

○小泉 亜未[1]、尾形 慎[2]、矢野 成和[3]、宮澤 拳[1]、吉見 啓[4,5]、佐野 元昭[6]、日髙 將文[1]、仁平 高則[7]、中井 博之[7]、木村 聡[8]、岩田 忠久[8]、阿部 敬悦[1,5]([1]東北大院・農、[2]福島大・農、[3]山形大院・理工、[4]京都大院・農、[5]東北大・NICHe、[6]金沢工大・ゲノム研、[7]新潟大・農、[8]東京大院・農)
○Ami KOIZUMI[1], Makoto OGATA[2], Shigekazu YANO[3], Ken MIYAZAWA[1], Akira YOSHIMI[4,5], Motoaki SANO[6], Masafumi HIDAKA[1], Takanori NIHIRA[7], Hiroyuki NAKAI[7], Satoshi KIMURA[8], Tadahisa IWATA[8], Keietsu ABE[1,5] ([1]Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ., [2]Fac. Food Agric. Sci., Fukushima Univ., [3]Grad. Sch. Sci. Eng., Yamagata Univ., [4]Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [5]NICHe, Tohoku Univ., [6]Genome Biotech. Lab., Kanazawa Inst. Tech., [7]Fac. Agric., Niigata Univ., [8]Grad. Sch. Agric. Life Sci., Tokyo Univ.)

糸状菌には特有の細胞壁多糖である α-1,3-グルカン（AG）が存在するが、その生合成機構および制御機構の詳細は未だ不明である。我々はこれまでに、細胞壁 AG 生合成に対して AG 合成酵素と協奏的な関与が示唆される麹菌 *Aspergillus oryzae* の GPI アンカー型 α-アミラーゼ、AgtA に着目し、本酵素の触媒特性を評価してきた[1)]。今回は、細胞壁 AG 生合成機構における AgtA の役割の更なる解明を目指し、AG の分子構造が AgtA の触媒活性に与える影響を明らかにすることを目的とした。本研究では、メタノール資化酵母を用いて異種発現した *A. oryzae* AgtA を酵素として、合成基質である *p*NP-α-マルトペンタオシドを基質として用いた。

初めに、AgtA の反応速度論解析を AG の少糖類であるニゲロースおよびニゲロトリオース添加系で評価した。結果、AgtA と基質のみの時と比較して、分解物を遊離する反応の触媒効率が向上した。さらに、AgtA によって基質由来のマルトオリゴ糖がニゲロースの非還元末端グルコース残基へ α-1,4-グリコシド結合で糖転移することを明らかにした。これら一連の結果は、糸状菌特有の細胞壁 AG と AgtA の関連性を示唆している。本発表では、これまでに明らかにした AgtA の諸性質と今回の結果を合わせて AgtA の酵素特性を報告し、細胞壁 AG 生合成と AgtA の関わりについて考察する。

1) 小泉亜未ら　日本農芸化学会 2020 年度（令和 2 年度）大会講演要旨集、P. 1655。

α-1,3-Glucan (AG) is a unique cell wall polysaccharide in filamentous fungi, but the detail mechanisms underlying biosynthesis and regulations of AG remain unclear. We previously reported catalytic properties of AgtA, a GPI-anchored α-amylase of *Aspergillus oryzae*, which is suggested to be involved in cell wall AG biosynthesis. This time, we aimed to clarify the effect of molecular structure of AG on the catalytic activity of AgtA in order to elucidate the role of AgtA in cell wall AG biosynthesis. In this study, *A. oryzae* AgtA heterologously expressed by using methanol-utilizing yeast was used as an enzyme and *p*NP-α-maltopentaoside, which is a synthetic substrate, was used as a substrate.

First, kinetic property of AgtA was analyzed with substrate and AG oligosaccharides, nigerose and nigerotriose. The catalytic efficiency of the reaction for releasing the decomposition products was improved as compared with AgtA and substrate alone. Next, it was revealed that the substrate-derived maltooligosaccharides were transferred to the non-reducing terminal glucose residue of nigerose by α-1,4-glycosidic bond by the reaction of AgtA. These results imply a relationship between cell wall AG biosynthesis and AgtA.

Aspergillus oryzae, α-amylase, nigerooligosaccharide
発表責任者：阿部敬悦（keietsu.abe.b5@tohoku.ac.jp）

講演番号：3G06-11
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:00～ ミーティングルーム G

麹菌 *Aspergillus oryzae* 由来ルチノシダーゼの構造及び酵素学的特性の解析

Structural and enzymological characterization of rutinosidase from *Aspergillus oryzae*

○廣田 瑠花[1]、真壁 幸樹[2]、田中 良和[3]、塩野 義人[1]、小関 卓也[1] ([1]山形大農、[2]山形大院理工、[3]東北大院生命)

○Ruka HIROTA[1], Koki MAKABE[2], Yoshikazu TANAKA[3], Yoshihito SHIONO[1], Takuya KOSEKI[1] ([1]Department of Biosciences, Faculty of Agriculture, Yamagata Univ., [2]Graduate School of Science and Engineering,Faculty of Engineering, Yamagata Univ., [3]Graduate School of Life Sciences, Tohoku Univ.)

ルチノシダーゼは、フラボノイドに 6-*O*-α-L-ラムノシル-β-D-グルコシド（ルチノース）がグリコシド結合したフラボノイド配糖体をアグリコンとルチノースに加水分解するジグリコシダーゼである。柑橘類の苦味や白濁化の原因であるフラボノイド配糖体を分解することで、飲料の苦味低減や清澄化、機能性を持つフラボノイドの回収などの産業利用が期待できる。一方、ルチノシダーゼはフラボノイドにβ-グルコースが結合している配糖体に対するグリコシダーゼ活性も報告されている[1)]。本研究では、GH5 サブファミリー23 に属する *Aspergillus oryzae* 由来ルチノシダーゼ（*Ao*Rut）の構造および酵素学的諸性質を明らかにすることを目的として、*Ao*Rut の X 線結晶構造解析、基質特異性解析、熱安定性解析を行った。

A. oryzae 由来ルチノシダーゼのシグナル配列を含めた *Aorut* を *P. pastoris* KM71H 株で発現させ、各種クロマトグラフィーにて精製を行い、*Ao*RutM を取得した。endoH 処理により糖鎖除去した *Ao*RutM を用いて、*Candida albicans* 由来 Exo-β-(1,3)-glucanase をモデルとして、分子置換法にて構造を決定した。1.7Åの分解能で決定した *Ao*RutM の構造は$(\beta/\alpha)_8$TIM バレルフォールドからなる GH ファミリー5 に典型的な構造を有しており、既に報告されている *Aspergillus niger* 由来のルチノシダーゼの構造と非常に類似していたが[1)]、N 型糖鎖修飾の位置など異なる特徴もあった。また 7 種の基質に対する活性を評価した結果、本酵素は 3-*O*-結合および 7-*O*-結合のフラボノイドルチノシドに加えて、フラボノイドβグルコシド対する加水分解能も認められた。また精製した酵素タンパク質と endoH 処理により糖鎖を除去した酵素タンパク質でそれぞれの熱安定性を測定ところ、endoH 処理により脱糖鎖した *Ao*RutM の方が糖鎖付加した *Ao*RutM よりも熱安定性が高いことが認められた。

1)Pachl et al, FEBS J, 287, 3315-3327(2020)

6-*O*-α-L-rhamnopyranosyl-β-D-glucosidase(rutinosidase)is the enzyme that hydrolyze flavonoid glycoside to flavonoid aglycon and glycon. This work reports the rutinosidase from *Aspergillus oryzae* which is classified GH5 subfamily 23 as well as rutinosidase from *Aspergillus niger* (*An*Rut).

In this study, the rutinosidase-encoding gene, *Aorut*, including the native signal sequence from *A.oryzae* was expressed in *Pichia pastoris* and structural analysis was performed. The crystal structure of *Ao*RutM with endoH treatment was determined to a resolution of 1.7Å and was represented by a$(\beta/\alpha)_8$TIM barrel fold with structural similarity of a *An*Rut. On the other hand, biochemical analysis showed the activity not only on flavonoid rutinoside but also on flavonoid-β-glucoside. Unexpectedly, *Ao*RutM exhibited increased thermostability after treatment with endH.

Aspergillus oryzae, Rutinosidase, Crystal structure

講演番号：3G06-12
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:00～ ミーティングルーム G

Microbacterium 属細菌由来 β-*N*-アセチルヘキソサミニダーゼの構造機能相関解析
Studies on structure-function relationships of β-*N*-acetyl hexosaminidase from *Microbacterium* sp.
○玉井 海地[1]、加藤 雄己[2]、河合 広洋[1]、川崎 寿[3]、夏目 亮[1,2] ([1]東電大院・工、[2]東電大・工、[3]東大・生物工学セ)
○Kaichi TAMAI[1], Yuki KATO[2], Koyo KAWAI[1], Hisashi KAWASAKI[3], Ryo NATSUME[1,2] ([1]Grad. Sch. of Eng., Tokyo Denki Univ., [2]Dept. of Eng., Tokyo Denki Univ., [3]Biotech. Res. Center, Univ. of Tokyo)

Microbacterium sp. は *O* 型糖ペプチド合成に有用な endo-α-*N*-アセチルガラクトサミニダーゼを菌体外分泌タンパク質として生産する土壌微生物である。この菌は β-*N*-アセチルヘキソサミニダーゼ（m-Hex）も分泌生産する。m-Hex も *O* 型糖ペプチド合成に有用な酵素の候補であるため、本研究では m-Hex の構造機能相関を明らかにする目的で、組換え m-Hex の生化学的解析と結晶構造解析を行った。*Microbacterium* sp.のゲノムから見出した m-Hex の候補遺伝子で組換え発現させたタンパク質を 3 段階のカラムクロマトグラフィーで精製し、高純度な試料を得た。精製試料は GlcNAcβ-*p*NP を加水分解して *p*NP を遊離させた一方で α 型基質には活性を示さなかったことから、当該遺伝子がコードするタンパク質が m-Hex であることが明らかになった。m-Hex の至適反応温度は 50 ℃、至適反応 pH は pH 6.0、50 ℃までの熱処理でも活性を保持していることが分かった。また、m-Hex とアミノ酸配列が 32.5 %相同な枯草菌由来 β-*N*-acetylglucosaminidase (b-Hex) の阻害剤 PUGNAc によって、m-Hex も活性が阻害された。m-Hex と PUGNAc の共結晶構造は枯草菌由来のものと非常に類似していた。総合すると、m-Hex は b-Hex 同様の Asp-His dyad mechaninsm で活性を示すことが示唆された。
Microbacterium sp. is a soil microorganism producing a secreting endo-α-*N*-acetylgalactosaminidase that is potentially useful for synthesizing *O*-linked glycopeptides. This bacterium also produces a secreting β-*N*-acetyl hexosaminidase (m-Hex). Since m-Hex is also potentially useful for *O*-linked glycopeptide synthesis, the biochemical and structural analysis of recombinant m-Hex were carried out aiming to elucidate the structure-function relationship of m-Hex. A candidate gene of m-Hex was found in the genome of *Microbacterium* sp. and cloned. The protein coded by this gene was recombinantly expressed, and purified to near homogeneity by three steps of column chromatography. The purified protein catalyzed the hydrolysis of GlcNAcβ-*p*NP releasing *p*NP, in while it showed no activities for the α-type substrate, indicating that the cloned gene codes m-Hex. The biochemical analysis showed that the optimal reaction temperature and pH of m-Hex were 50 °C and 6.0, respectively. It was shown that m-Hex retained its activity even after heat treatment below 50 °C. The activity of m-Hex was inhibited by PUGNAc, an inhibitor of β-*N*-acetylglucosaminidase from *Bacillus subtilis* (b-Hex), which amino acid sequence identity is 32.5 % to m-Hex. The crystal structure of m-Hex with PUGNAc was very similar with that of b-Hex. Together, it was suggested that m-Hex showed its activity by the Asp-His dyad mechanism same as b-Hex.

β-*N*-acetyl hexosaminidase, crystal structure, *Microbacterium*

発表責任者：Ryo Natsume（natsume@mail.dendai.ac.jp）

講演番号：3G06-13
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:00～ ミーティングルーム G

ウェルシュ菌 *Clostridium perfringens* が持つ糖質加水分解酵素 GH95 の機能解析

Functional analysis of a glycoside hydrolase family 95 enzyme from *Clostridium perfringens*

○中島 有登、加藤 紀彦、片山 高嶺（京大生命）
○Aruto NAKAJIMA, Toshihiko KATOH, Takane KATAYAMA (Kyoto Univ.)

【背景】腸内細菌は宿主の健康や疾患と密接に関与し、特に、幼少期において形成される細菌叢は生涯に亘って持続的な影響をもたらす。一般に、母乳栄養児の腸管においては、母乳中に含まれるヒト母乳オリゴ糖（HMOs）を *Bifidobacterium* 属細菌が菌種特異的に資化することで *Bifidobacterium* 属細菌が豊富な細菌叢が形成される。2′-Fucosyllactose（2′-FL）は、母親の遺伝子型（*FUT2*）にもよるが主要な HMO 分子の一つであり、近年、欧米諸国において調製乳への添加が始まるなど重要性が認識されている。腸内細菌による 2′-FL の資化には 1,2-α-L-fucosidase（AfcA）が重要であることが *Bifidobacterium bifidum* を対象とした研究で明らかとされているが、そのホモログは他の複数の腸内細菌種にも保存されており、その一部には病原性を持ち壊死性腸炎を惹起する *Clostridium perfringens*（ウェルシュ菌）も含まれる。しかしながら、ウェルシュ菌の AfcA については十分に検討されてこなかった。

【方法・結果】*C. perfringens* JCM 1290^{T} ゲノムをテンプレートとして PCR を行い、AfcA ホモログ遺伝子をクローニングし、組換え酵素として大腸菌で発現させた。また、精製酵素を用いて酵素学的諸性質を決定した。その結果、ウェルシュ菌が持つ AfcA ホモログは 2′-FL などの H 抗原を有する基質に作用することが明らかとなった。本講演では、*B. bifidum* 由来の酵素との比較を行うことで、ウェルシュ菌の AfcA の性質について議論する。

Gut microbes significantly affect host health and diseases, and the microbiota established in early life considerably influences life-long health outcome of the host. In general, in the breast-fed infant intestines, bifidobacteria-rich microbiota is formed as the consequences of species-specific bifidobacterial consumption of human milk oligosaccharides (HMOs) contained in breastmilk. 2′-Fucosyllactose (2′-FL) is known to be one of the major components of HMOs, though its secretion is dependent on mother's secretor status (*FUT2*), and recently, many western countries have started to add 2′-FL to infant formula as fortification. We previously isolated the 1,2-α-L-fucosidase (AfcA) gene from *Bifidobacterium bifidum* and showed that AfcA is the key enzyme to degrade 2′-FL. During the course of the study, we found that AfcA homologs are distributed in several gut microbes, including *Clostridium perfringens*, an important food-born pathogen that can cause severe enterocolitis. However, little is known about *C. perfringens* AfcA. In this presentation, we report recombinant expression, purification, and characterization of *C. perfringens* AfcA.

Clostridium perfringens, glycoside hydrolase family 95, 2'-fucosyllactose

発表責任者：片山高嶺（katayama.takane.6s@kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3G06-14
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:00～ ミーティングルーム G

Thermosipho melanesiensis 由来の GH130 タンパク質 Tmel_1013 の機能解析
Functional analysis of GH130 protein Tmel_1013 from *Thermosipho melanesiensis*

○三井 智子[1]、玉田 梨恵[1]、佐分利 亘[2]、森 春英[2]([1]北大農、[2]北大院農)
○Satoko MITSUI[1], Rie TAMADA[1], Wataru SABURI[2], Haruhide MORI[2] ([1]Sch. Agr., Hokkaido Univ., [2]Res. Fac. Agr., Hokkaido Univ.)

研究背景) 糖質加水分解酵素ファミリーGH130 は，β-マンノシドに作用する加リン酸分解酵素を主とする酵素群である．GH130 の代表的酵素 β-(1→4)-マンノオリゴ糖ホスホリラーゼ（MOP）と Manβ1-4GlcNAc ホスホリラーゼ（MNP）の間で，タンパク質全体の配列類似性は高く，サブサイト＋1 を構成するアミノ酸残基による局所的な構造の違いが基質特異性に重要である．例えば，MNP では，サブサイト+1 における GlcNAc への特異性に重要な疎水性残基が保存される．*T. melanesiensis* 由来推定 GH130 酵素 Tmel_1013 は，*N*-グリカン代謝に関わると推定される遺伝子クラスターに含まれる遺伝子にコードされるが，MNP 活性に重要な残基を持たず，その機能に興味が持たれた．そこで，本研究では，Tmel_1013 の機能を解析した．

結果と考察) 組換え酵素 Tmel_1013 を大腸菌形質転換体により生産し，精製した．Tmel_1013 は加リン酸分解反応において，二糖の Manβ1-4Man，Manβ1-4Glc，および Manβ1-4GlcNAc にほぼ同等の k_{cat}/K_m（それぞれ 0.687，0.970，および 0.967 $s^{-1}mM^{-1}$）を示し，サブサイト＋1 において広い特異性を示した．二糖よりも三糖以上の β-(1→4)-マンノオリゴ糖に著しく高い k_{cat}/K_m（Man_3，Man_4 に対し，それぞれ 6.03，6.30 $s^{-1}mM^{-1}$）を示した．すなわち，Tmel_1013 は β-(1→4)-マンノオリゴ糖を良い基質とする MOP でありながら，MNP 活性をも備える酵素であることが明らかになった．

Background) Glycoside hydrolase family 130 mainly contains the phosphorylases acting on β-mannosides. Two major GH130 enzymes, β-1,4-mannooligosaccharide phosphorylase (MOP) and 1,4-β-mannosyl-*N*-acetylglucosamine phosphorylase (MNP), share the similar overall amino-acid sequences, but with distinctive residues in subsite +1: hydrophobic residues for interaction with GlcNAc moiety are found only in MNP, for instance. Putative GH130 protein, Tmel_1013 from *T. melanesiensis*, does not have the residues, although it is predicted to be involved in the *N*-glycan metabolism based on the gene organization. In this study, we analyzed the enzymatic function of Tmel_1013.

Results and discussion) Recombinant Tmel_1013 was produced in *E. coli* transformant and purified. For Manβ1-4Man, Manβ1-4Glc, and Manβ1-4GlcNAc, Tmel_1013 showed equivalent k_{cat}/K_m (0.687, 0.970, and 0.967 $s^{-1}mM^{-1}$, respectively) in the phosphorolysis reaction. It also showed significantly higher k_{cat}/K_m for β-(1→4)-mannotriose (6.03 $s^{-1}mM^{-1}$) and mannotetraose (6.30 $s^{-1}mM^{-1}$) than the disaccharides. In conclusion, Tmel_1013 is a MOP but it also has the activity of MNP.

Glycoside hydrolase family 130, Mannoside phosphorylase, *N*-glycan metabolism

発表責任者：三井智子（satoko1998@eis.hokudai.ac.jp）

講演番号：3G06-15
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:00～ ミーティングルーム G

バリオボラックス属細菌由来(R)-β-Phe アミノアシラーゼの cryo 電顕単粒子解析と変異体解析
Single particle analysis by cryoEM and mutational analysis of (*R*)-β-Phe aminoacylase derived from *Variovorax* sp.

○棚橋 貴大[1]、加藤 雄己[2]、安達 成彦[4]、川崎 寿[3]、夏目 亮[1,2]([1]東電大院・工、[2]東電大・工、[3]東大・生物工学セ、[4]高エネ研・物工研)
○ Takahiro TANAHASHI[1], Yuki KATO[2], Naruhiko ADACHI[4], HISASHI KAWASAKI[3], Ryo NATSUME[1,2] ([1]Grad of Eng., Tokyo Denki Univ., [2]Dept. of Eng., Tokyo Denki Univ., [3]Biotech. Res. Center, Univ. of T, [4]SBRC,KEK)

β-フェニルアラニン（β-Phe）は医薬品の合成原料として有用な物質である。β-Phe は化学合成できるものの *S* 体と *R* 体が混在したラセミ体で生成されるため、利用するにはエナンチオマーの分離が必要である。我々は、(*R*)-β-Phe のエナンチオマー分離に利用可能な酵素(*R*)-β-Phe アミノアシラーゼ（(*R*)-β-PheAA）の構造機能相関を解析している。(*R*)-β-PheAA は、アミノ基をアセチル化したラセミ体の β-Phe (*N*-Ac-(*R, S*)-β-Phe)に対して *R* 体特異的にアミド結合を加水分解して enantio-pure な(*R*)-β-Phe を生成する酵素である。*Variovorax* 属細菌由来(*R*)-β-Phe アミノアシラーゼ（(*R*)-β-PheAA）の構造解析に向けて結晶化を重ねてきたが、X 線結晶構造解析に適した結晶を得ることができなかった。そこで、BINDS の支援を受けて、クライオ電子顕微鏡を用いた単粒子解析を試みた。その結果、*Variovorax* 属細菌由来(*R*)-β-PheAA のクライオ電子顕微鏡構造を決定することに成功した。すでに結晶構造解析に成功していた *Burkholdelia* 属細菌由来(*R*)-β-PheAA と同様に二量体を形成していることや、両酵素の基質結合部位と予想されるアミノ酸残基のコンフォメーションが良く似ていることなどが判った。*Variovorax* 属細菌由来(*R*)-β-PheAA の基質結合部位と予想されるアミノ酸残基 5 箇所をアラニン置換したところ、変異体の活性はほぼ失われた。現在、さらに新規の変異体解析を進めている。

β-Phenylalanine (β-Phe) is a useful substance as a material for synthesizing pharmaceutical agents. Since β-Phe is chemically synthesized in a racemic mixture of *S* and *R* forms, it is necessary to separate the enantiomer to use them. (*R*)-β-phenylalanine aminoacylase ((*R*)-β-PheAA) is an enzyme that hydrolyzes the amide-bond of *N*-acetyl-(*R*)-β-phenylalanine and produces enantio-pure (*R*)-β-phenylalanine. In the previous studies, efforts were made to crystallize (*R*)-β-PheAA derived from *Variovorax* sp. for structural analysis. However, no crystals suitable for crystallography were obtained. Recently, the structural analysis of *Variovorax*-derived (*R*)-β-PheAA by single particle analysis using a cryo-electron microscope (cryo-EM) was tried being supported by BINDS. As a result, the cryo-EM structure of *Variovorax*-derived (*R*)-β-PheAA was determined successfully at near atomic-resolution. It was revealed that *Variovorax*-derived (*R*)-β-PheAA forms a dimer, as the crystal structure of *Burkholdelia*-derived (*R*)-β-Phe AA. The residues expected to form a substrate-recognition/binding site of both enzymes share almost the same conformation. Alanine substitution on 5 residues expected to form the putative substrate-recognition/binding site abolished the activities of *Variovorax*-derived (*R*)-β-PheAA. Further mutational analysis is being performed.

(*R*)-β-Phe aminoacylase, Single particle analysis, *Variovorax*

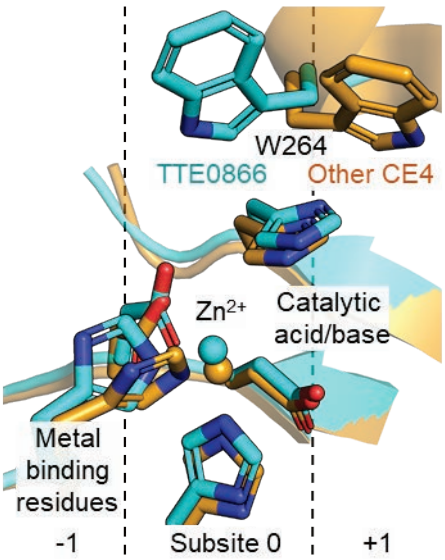
発表責任者：Ryo Natsume（natsume@mail.dendai.ac.jp）

講演番号：3G06-16
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:00～ ミーティングルーム G

Caldanaerobacter subterraneus 由来 TTE0866 アセチルキシランエステラーゼの構造・機能解析

Structural and functional analysis of TTE0866 acetylxylan esterase from *Caldanaerobacter subterraneus*

○佐々本 康平[1,2]、下澤 勇弥[1,2]、氷見山 幹基[1]、森芳 邦彦[3]、大本 貴士[3]、上垣 浩一[1,4]、西矢 芳昭[2]、中村 努[1]（[1]産総研、[2]摂南大院理工、[3]大阪産技研、[4]近大農）
○Kohei Sasamoto[1,2], Yuya Shimozawa[1,2], Tomoki Himiyama[1], Kunihiko Moriyoshi[3], Takashi Ohmoto[3], Koichi Uegaki[1,4], Yoshiaki Nishiya[2], Tsutomu Nakamura[1] ([1]AIST, [2]Grad. School Sci. Eng. Setsunan Univ., [3]ORIST, [4]Kindai Univ.)



Carbohydrate esterase family 4（CE4）に属するアセチルキシランエステラーゼ（AXE）は、糖の脱アセチル化を触媒する金属酵素である。*Caldanaerobacter subterraneus* subsp. *tengcongensis* 由来 AXE（TTE0866）は、酢化度が高いアセチルセルロースの脱アセチル化を触媒するため、資源の再利用の観点から産業応用が期待されるものの、その結晶構造は不明であった。本研究では、TTE0866 の結晶構造を決定し、本酵素が酢化度の高いアセチルセルロースに反応する要因を、他の CE4 酵素との比較により考察した。

X 線結晶構造解析により、TTE0866 の触媒ドメインは $(\beta/\alpha)_8$ バレル構造を有し、CE4 酵素に高度に保存される触媒残基と金属イオンの配位を確認した（図）。しかし、TTE0866 と他の CE4 酵素では、活性中心近傍の W264 残基の配向が大きく異なった。これまでに報告された CE4 酵素の W264 相当残基は subsite +1 に位置し、基質結合に寄与する。しかし、TTE0866 の W264 残基は subsite 0 に位置し、他の CE4 酵素と基質認識機構が異なる可能性が示唆された。今後 TTE0866 の酵素特性評価や基質複合体の構造解析から、基質認識機構の解明を目指す。

Acetylxylan esterase (AXE), classified as carbohydrate esterase family 4 (CE4), is a metalloenzyme that catalyzes the deacetylation of acetylated carbohydrate. TTE0866 catalyzes the deacetylation of highly substituted acetylcellulose and is expected to be useful for industrial applications into resource reuse. However, its crystal structure has not been determined. In this study, the crystal structure of TTE0866 was revealed and was compared with those of other CE4 enzymes to discuss the mechanisms of suitability for highly substituted acetylcellulose.

X-ray crystallographic analysis revealed that the catalytic domain of TTE0866 had a $(\beta/\alpha)_8$ barrel topology, and an active site highly conserved in the CE4 enzymes (Figure). However, the TTE0866 had a significantly different orientation of the W264 residue near the active site comparing with other CE4 enzymes. In other CE4 enzymes, the residue corresponding to the W264 residue of TTE0866 orients to subsite +1 in the substrate binding site and is involved in substrate binding. On the other hand, the W264 residue of TTE0866 was oriented to subsite 0, suggesting that the substrate recognition mechanism is different from other CE4 enzymes.

Carbohydrate esterase, Crystal structure, Acetylcellulose

発表責任者：中村　努（nakamura-t@aist.go.jp）

講演番号：3G06-17
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:00～ ミーティングルーム G

ユニークな基質特異性を持つ出芽酵母の新規ヘキソキナーゼ

A novel hexokinase from budding yeast with distinctive substrate specificity

濱田 海斗、磯野 直人、苅田 修一、○梅川 碧里（三重大生資）
Kaito HAMADA, Naoto ISONO, Shuichi KARITA, ○Midori UMEKAWA (Mie Univ.)

ヘキソキナーゼは、真核生物の細胞内で解糖系の初段のグルコースのリン酸化を触媒する重要な糖質代謝酵素である。出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* においては、グルコースのリン酸化を担う３つのヘキソキナーゼ(Hxk1, Hxk2, Glk1)のみが、これまでに認知されていた。本研究では、出芽酵母の新たなヘキソキナーゼを見出すことを目的として、既知ヘキソキナーゼに類似性を示す２種類の機能未知タンパク質の解析を行った。

出芽酵母の２種類のヘキソキナーゼ様タンパク質に His タグを付加した組換えタンパク質を大腸菌で発現させニッケルカラムで精製した後、異なる基質に対する酵素活性を解析した。その結果、ヘキソキナーゼ様タンパク質である Emi2 は、グルコースやフルクトースに対して高い活性を示すヘキソキナーゼであることがわかった。一方、もう一つのヘキソキナーゼ様タンパク質は、グルコースよりも *N*-アセチルグルコサミンに対して高いリン酸化活性を示し、既知ヘキソキナーゼとは異なる基質特異性を有するヘキソキナーゼであることが見い出された。

Hexokinases catalyze glucose phosphorylation at the first step in glycolysis, which is important for carbohydrate metabolism. So far, in budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*, three hexokinases (Hxk1, Hxk2 and Glk1) which catalyze glycose phosphorylation have been known. In this study, we focused on and analyzed enzymatic activities of two uncharacterized hexokinase-like proteins to find out a novel hexokinase in budding yeast.

We obtained two recombinant His-tagged proteins of yeast hexokinase-like proteins to analyze enzymatic activities. We found that hexokinase-like protein Emi2 is a hexokinase which preferentially phosphorylates glucose and fructose. In contrast, another hexokinase-like protein was found to have higher kinase activity toward *N*-acetylglucosamine than glucose, unlike other known hexokinases.

Carbohydrate metabilism, Hexokinase, Yeast

発表責任者：梅川碧里（midoriumekawa@bio.mie-u.ac.jp）

講演番号：3H02-01
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:30～ ミーティングルーム H

ムラサキのシコニン・アルカニン誘導体生産におけるアシル基転移酵素の機能分化
Functional differentiation of acyltransferases involved in the production of shikonin/alkannin derivatives in *Lithospermum erythrorhizon*.

○押切 春佳[1]、李 豪[2]、渡辺 文太[3]、山本 浩文[4]、矢崎 一史[2]、高梨 功次郎[1,5]([1]信州大院・総合医理工、[2]京大・生存研、[3]京大・化研、[4]東洋大・生命科学、[5]信州大・理)
○Haruka Oshikiri[1], Hao Li[2], Bunta Watanabe[3], Hirobumi Yamamoto[4], Kazufumi Yazaki[2], Kojiro Takanashi[1,5] ([1]Grad. Sch. Med., Sci. & Tech., Shinshu Univ., [2]RISH, Kyoto Univ., [3]ICR, Kyoto Univ., [4]Fac. Life Sci., Toyo Univ., [5]Fac. Sci., Shinshu Univ.)

薬用植物ムラサキ (*Lithospermum erythrorhizon*) は、根の表皮において紅色を呈するナフトキノン誘導体であるシコニンおよびアルカニンを生産する。シコニンとアルカニンは互いに鏡像異性体の関係にあり、これらのほとんどがアセチル化を主としたアシル化修飾を受けてアポプラストに輸送されるが、その生合成経路および輸送機構は未だ全容解明に至っていない。本研究では、ムラサキ培養細胞においてシコニン・アルカニン誘導体生産条件特異的に発現が上昇する BAHD アシル基転移酵素がシコニン・アルカニンのアシル化に関与すると推測し、機能解析を行った。候補とした 5 分子種を単離し、大腸菌に異種発現させて酵素活性を測定したところ、既に報告した 2 分子種 (LeSAT1、LeAAT1) に加えて新たに 2 分子種 (LeSAT2、LeAAT2) がシコニンもしくはアルカニンに特異的なアシル化活性を示した。LeSATs および LeAATs はいずれもアシル基供与体としてアセチル CoA だけでなく、イソブチリル CoA やイソバレリル CoA も基質とし、種々のシコニン・アルカニン誘導体を生成した。本発表では LeSATs および LeAATs の酵素特性について評価し、これらのシコニン・アルカニン誘導体生産における機能分化について議論する。

Lithospermum erythrorhizon produces red naphthoquinone pigments, shikonin/alkannin derivatives, in the root bark. Shikonin (*R*) is an enantiomer of alkannin (*S*), and most of these compounds were accumulated in the apoplast in the acylated forms in *L. erythrorhizon*. To elucidate the biosynthesis pathway of shikonin/alkannin derivatives, we analysed BAHD acyltransferases specifically expressed in shikonin/alkannin producing cells of *L. erythrorhizon*. Enzyme assays with five candidate BAHDs using recombinant proteins expressed in *Escherichia coli* showed that two enzymes (LeSAT1 and LeSAT2) had shikonin-specific acyltransferase activity, whereas another two enzymes (LeAAT1 and LeAAT2) had alkannin-specific activity. These four enzymes recognized isobutyryl-CoA and isovaleryl-CoA in addition to acetyl-CoA as acyl donor and produced their corresponding shikonin/alkannin derivatives. In this meeting, we will discuss their functional differentiation with evaluating their enzymatic properties.

Shikonin/Alkannin derivatives, Acyltransferase, *Lithospermum erythrorhizon*

発表責任者：高梨　功次郎（Takanashi@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：3H02-02
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:30～ ミーティングルーム H

シコニン／アルカニン生合成経路で働く geranylhydroquinone 水酸化酵素の基質特異性

Substrate specificity of geranylhydroquinone hydroxylase in shikonin/alkannin biosynthetic pathway

○吉村 和貴[1]、渡辺 文太[2]、中川 友喜美[3]、矢崎 一史[3]、高梨 功次郎[4] ([1]信州大・総合理工、[2]京大・化研、[3]京大・生存研、[4]信州大・理)

○ Kazuki Yoshimura[1], Bunta Watanabe[2], Yukimi Nakagawa[3], Kazufumi Yazaki[3], Kajiro Takanashi[4] ([1]Grad. Sch. of Sci. & Tech., Shinshu Univ., [2]ICR, Kyoto Univ., [3]RISH, Kyoto Univ., [4]Fac. of Sci., Shinshu Univ.)

薬用植物であるムラサキ（*Lithospermum erythrorhizon*）の根において生産されるシコニン／アルカニンは抗菌作用や抗炎症作用を有するため、ムラサキの根を乾燥させた紫根は皮膚疾患などに有効な生薬として古くから使用されている。本研究では、シコニン／アルカニンの生合成中間体のひとつ geranylhydroquinone (GHQ) を基質とし、その 3" 位の水酸化反応への関与が推測される cytochrome P450 (LeP450s) の機能解析を行った。まず、RNA-seq 解析でシコニン生産時に特異的に発現していた 4 分子種の LeP450s を出芽酵母に異種発現し、粗酵素の酵素活性を測定したところ、2 分子種が GHQ の 3" 位の水酸化活性を示した。次に、これらのうち酵素活性の高い 1 分子種について、12 種の化合物を用いて基質特異性を検討した。その結果、GHQ の上流に位置するシコニン／アルカニンの生合成中間体 *m*-geranyl-*p*-hydroxybenzoic acid に加え、4-*O*-methyl-GHQ および 2',3'-dihydro-GHQ に対しても 3" 位を水酸化することが明らかとなった。本発表では、GHQ の 3" メチル基をエチニル基に置換した化合物について、本酵素に対する阻害活性、および、ムラサキ培養細胞に与える影響を検討した結果も併せて報告する。

Shikonin and its derivatives have a variety of bioactivities such as anti-microbial and anti-adenovirus activities, as well as inducing apoptosis on virus-infected hepatocytes, thus medicinal plants producing these compounds are utilized around the world. *Lithospermum erythrorhizon* and *Arnebia euchroma* are typical Bpraginaceae plants that synthesize shikonin and are used as herbal medicine in East Asia. In shikonin biosynthesis, an intermediate *m*-geranyl-*p*-hydroxybenzoic acid (GBA) is synthesized from geranyl diphosphate and *p*-hydroxybenzoic acid. GBA is them converted into 3”-hydroxygeranylhydroquinone, followed by a cyclization and several oxidation steps to yield shikonin. Very recently, three cytochrome P450 enzymes that hydroxylate 3” position of the geranylhydroquinone to yield 3”-hydroxygeranylhydroquinone have been found in *L. erythrorhizon* and *A. euchroma*. However, the substrate specificities of these enzymes are still unknown. In this study, we studied the substrate specificity of a cytochrome P450 enzyme of *L. erythrorhizon* that catalyzes the 3”-hydoxylation of geranylhydroquinone with chemically synthesized 12 analogues of geranylhydroquinone.

Cytochrome P450, Shikonin, *Lithospermum erythrorhizon*

発表責任者：高梨功次郎（takanashi@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：3H02-03
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:30～ ミーティングルーム H

RNA-Seq 解析を利用したムラサキにおける栄養依存的なシコニン産生抑制機序の推定

RNA-Seq based identification of the biological processes involved in the nutrient-dependent suppression of Shikonin production in *Lithospermum erythrorhizon*

○岡田 貴裕[1]、松田 紗良[2]、丸岡 早紀[2]、松本 雄一[2]、末岡 昭宣[3]、渡邉 啓一[2]([1]佐賀大医、[2]佐賀大農、[3]新日本製薬)
○Takahiro OKADA[1], Sara MATSUDA[2], Saki MARUOKA[2], Yuichi MATSUMOTO[2], Akinobu SUEOKA[3], Keiichi WATANABE[2] ([1]Fac. Med. Saga Univ., [2]Fac. Agr. Saga Univ., [3]Shinnihonseiyaku)

ムラサキ(*Lithospermum erythrorhizon*)は古来より日本全土に分布する多年草であり、その根は生薬「紫根」として創傷や殺菌に広く利用されている。紫根の有効成分はシコニンをはじめとするナフトキノン類であり、その生合成系はメバロン酸経路、メチルエリスリトールリン酸経路、フェニルプロパノイド経路を介した複合的な経路からなることが推定されている。しかしながら、関連遺伝子群のコード配列や発現情報が限定的であり、且つ作物栽培学的な研究が進んでいないために、有効成分の産生効率が植物体レベルでどのように制御されているかについては現在もなお不明な点が多い。したがって、薬用価値の高い紫根の安定生産を図る上では、二次代謝の特性や生化学的基盤をより詳細に把握し、これらの適切な制御アプローチを確立することが重要なポイントになってくる。

このような観点から、我々は紫根の品質と環境要因との関連について調査を進めており、栄養過多な土壌で育てた場合にシコニンの蓄積量が顕著に抑制されることを新たに見いだした。本発表では、この栄養依存的な事象に着目し、RNA-Seq 比較発現解析データをもとに土壌の栄養状態が関連する根の生育プロセス、さらに、栄養過多によって変動がもたらされるシコニンの生合成経路および二次代謝プロセスを推定した結果について紹介する。

Lithospermum erythrothizon (red gromwell) is one of the major perennial plants cultivated in Japan. The root from red gromwell contains beneficial naphthoquinones such as Shikonin, and have been widely used for medical treatments based on their wound-healing and anti-microbial properties. It has been estimated that the biosynthetic process of Shikonin is composed of multiple pathways, including mevalonate pathway, methylerythritol phosphate pathway, and phenylpropanoid pathway. However, the regulatory mechanism underlying Shikonin production remains unclear due to the limitation of genetic database resources and agronomic studies.

In recent, our group has found the phenomenon that nutrient-rich condition clearly suppresses the accumulation of Shikonin in red gromwell root. In this presentation, we show the correlation between soil fertility and the alteration of development process/second metabolism suggested by RNA-Seq based comparative expression analysis.

Lithospermum erythrorhizon, Shikonin, RNA-Seq

発表責任者：岡田貴裕（e7316@cc.saga-u.ac.jp）

講演番号：3H02-04
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:30～ ミーティングルーム H

アマランチン合成酵素遺伝子の単離

Isolation of *amaranthin synthetase* from *Chenopodium quinoa*

○今村 智弘[1]、五十棲 規嘉[2]、東村 泰希[1]、宮里 朗夫[2]、大木 進野[2]、森 正之[1] ([1]石川県立大学、[2]北陸先端大)
○Tomohiro IMAMURA[1], Noriyoshi Isozumi[2], Yasuki Higashimura[1], Akio Miyazato[2], Shinya Ohki[2], Masashi Mori[1] ([1]Ishikawa Pref. Univ., [2]JAIST)

ベタレイン色素は、ナデシコ目植物が主に生産する色素である。ベタレイン色素は、赤色や紫色のベタシアニンと黄色や橙色のベタキサンチンの２種類に大別される。ベタシアニン生合成に関して、これまでの研究によりベタニンまでの生合成経路は明らかにされている。我々は、ベタニン以降のベタシアニン生合成に関わる遺伝子についてヒユ科植物であるキヌアを用いて単離を試みた。キヌア芽生えの胚軸には、アマランチンとセロシアニン II を蓄積していた。アマランチンは、ベタニンを前駆物質として合成することが予測されることから、キヌアの胚軸には、ベタニンからアマランチンを合成する酵素の存在が予想される。そこで、アマランチン合成遺伝子を単離するために、ブラボノイド生合成に関わる酵素であるが、反応が類似していたアラビドプシス flavonoid 3-*O*-glucoside 2″-*O*-glucosyltransferase をもとにして相同性検索と系統樹解析を行なった。その結果、フラボノイド生合成とは異なる、ヒユ科植物のみで形成する新規クラスターを得ることができた。そのクラスターに属する遺伝子について、キヌア胚軸での発現を調査したところ３つの遺伝子が発現していた。この選抜した３遺伝子について、さらなる詳細な解析を試みた。

Betalains are tyrosine-derived pigments found exclusively in plants of the order Caryophyllales, some *Basidiomycota* fungi. Previous studies have demonstrated that betalains exhibit strong antioxidant activity and are involved in responses to both stress and environmental stimuli in plants. Because betalain possesses anti-inflammatory and anticancer activities, it may be useful as a pharmaceutical agent and dietary supplement. Recent studies have identified the genes involved in the betalain biosynthesis of betanin. However, subsequent genes for betalain biosynthesis have not been isolated. Amaranthin and celosianin II are abundant in the quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) hypocotyl, and amaranthin comprises glucuronic acid bound to betanin; therefore, this suggests the existence of a glucuronyltransferase involved in the synthesis of amaranthin in the quinoa hypocotyl. In this study, we tried to identify the gene involved in amaranthin biosynthesis.

Betalain, Amaranthin, Quinoa

発表責任者：今村　智弘（timamura@ishikawa-pu.ac.jp）

講演番号：3H02-05
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:30～ ミーティングルーム H

Production of flavonoid *C*-glucosides in *E. coli* expressing a plant glucosyltransferase

○NASANJARGAL DORJJUGDER, HATANO MAYU, TAGUCHI GORO (Shinshu Univ.)

Flavonoids are common secondary metabolites in plants and they usually exist in *O*- and *C*-glycosylation forms. The *C*-glycosides are highly stable against enzymatic and acidic hydrolysis than the *O*-glycosides because of the special carbon-carbon bond which is a connection between aglycone and sugar moieties. Moreover, some of these *C*-glycosides such as isovitexin have antioxidant, anti-inflammatory, anti-diabetic, and neuroprotective activities in human health.

In this research, we tried to produce flavonoid 6-*C*-glucosides using recombinant *E. coli* expressing WjGT1, which is isolated from wasabi as a regiospecific CGT toward 6-position of flavonoids in our laboratory[1)].

The *E. coli* Rosetta 2(DE3) harboring pDEST15-WjGT1 plasmid (Ec-WjGT1) was inoculated for target enzyme expression. After the protein expression, the cell pellet was resuspended in M9 basal media and supplemented with flavonoids for the bioconversion into their *C*-glucosides. We also optimized some conditions for efficient conversion. The resulting compounds were purified and confirmed by LC-MS and NMR.

Ec-WjGT1 converted several flavonoids including flavones and flavonols into their 6-*C*-glucoside with a high conversion ratio (85-99%) after some optimization. This result demonstrated that this *E. coli* cell system has a high potential for the large-scale production of flavonoid *C*-glucosides.

1) Mashima et al. Plant Cell Physiol (2019) 60, 2733-2743

Flavonoid *C*-glucosides, *E. coli* bioconversion, *C*-glucosyltransferase

講演番号：3H02-06
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:30～ ミーティングルーム H

ダイズ根圏へのイソフラボン分泌に関与するβ-グルコシダーゼの機能解析

Functional analysis of a ß-glucosidase involving isoflavone secretions into soybean rhizosphere

○松田 陽菜子[1]、山崎 由実[1]、森吉 英子[1]、中安 大[1]、高瀬 尚文[2]、岡崎 伸[3]、加賀 秋人[4]、矢崎 一史[1]、杉山 暁史[1]（[1]京都大生存研、[2]京都先端大バイオ環境、[3]東京農工大農、[4]農研機構）
○Hinako MATSUDA[1], Yumi YAMAZAKI[1], Eiko MORIYOSHI[1], Masaru NAKAYASU[1], Hisabumi TAKASE[2], Shin OKAZAKI[3], Akito KAGA[4], Kazufumi YAZAKI[1], Akifumi SUGIYAMA[1] ([1]Kyoto Univ., [2]KUAS, [3]Tokyo Univ. of Agri. and Tech., [4]NARO)

根圏とは、植物根から影響を受ける根近傍の土壌領域と定義されている。ダイズ（*Glycine max*）根から根圏に分泌されるイソフラボンアグリコンは、根粒形成及び根圏微生物叢形成において機能するが、その分泌過程については十分に解明されていない。細胞内で生合成されるイソフラボンのアポプラストへの分泌については、ATP-binding cassette 型の輸送体を介したアグリコンの分泌経路と、イソフラボン配糖体がアポプラストに分泌された後、isoflavone conjugate-hydrolyzing beta-glucosidase (ICHG) によってアグリコンに分解される経路の 2 つが提唱されている。しかし、輸送体遺伝子は未同定であり、ICHG のイソフラボン分泌における役割も不明である。本研究では、エンレイ EMS 突然変異体ライブラリーより得られた *ichg* 遺伝子のナンセンス変異体とエンレイを戻し交雑し、*ICHG* 野生型と *ichg* 変異体を圃場栽培し、植物体及び根圏土壌のイソフラボンを定量した。開花始期 (R1 期) の根において、変異体ではアグリコンであるダイゼイン、ゲニステインの減少が見られた。さらに、変異体の根圏土壌においてもダイゼインやゲニステイン量の減少が認められた。これらの結果から、ICHG が根におけるイソフラボンアグリコンの蓄積や、根圏への分泌に重要な役割を担うことが示唆された。現在、根粒形成への影響について解析している。

Rhizosphere is a soil zone influenced by plant roots. Isoflavone aglycones secreted from soybean (*Glycine max*) roots are essential for rhizobium-soybean symbiosis and rhizosphere microbiome assembly, although the mechanism of their secretion into rhizosphere is poorly understood. ATP-binding cassette transporter-mediated aglycone transport, and the isoflavone conjugate-hydrolyzing beta-glucosidase (ICHG)-catalyzed reaction after the secretion of glucosides to the apoplast are proposed as aglycone-secretion pathways. However, transporter genes involved in the isoflavone transport and the function of ICHG *in planta* have not been identified. In this study, nonsense mutants of the *ichg* gene were obtained from Enrei EMS mutant library. *ICHG* wild-type and mutants derived from backcross progenies between the mutants and Enrei were grown in the field and isoflavones in leaves, roots, and rhizosphere soil at the reproductive stage (R1) were quantified by LC/MS. In the roots, the *ichg* mutants have a significantly lower amount of aglycones, including daidzein and genistein, than wild-type. Furthermore, reduced amounts of daidzein and genistein were also observed in the rhizosphere soil of the mutant. These results suggest that ICHG plays an important role in the accumulation of isoflavone aglycones in roots and their secretion into the rhizosphere. The effect on the rhizobium nodulation is currently being analyzed.

Soybean, isoflavone, ß-glucosidase

発表責任者：杉山暁史（akifumi_sugiyama@rish.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3H02-07
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:30～ ミーティングルーム H

根寄生雑草 *Striga* におけるジベレリン生理作用発現機構に関する研究

Study on the mechanism of gibberellin physiological functions in the root parasitic weed *Striga*

○陳 嘉政、高橋 郁夫、竹内 瑞穂、王 建文、中嶋 正敏、浅見 忠男（東大農）
○ Jiazheng CHEN, Ikuo TAKAHASHI, Mizuho TAKEUCHI, Jianwen WANG, Masatoshi NAKAJIMA, Tadao ASAMI (Tokyo Univ.)

Striga hermonthica は「魔女の雑草」とも呼ばれている半寄生植物であり、トウモロコシやイネなどの穀物の根に寄生し、宿主から水や栄養物質を奪い取って成長する。ストライガは世界中に大きな被害をもたらしており、年間被害額は 1 兆円前後と言われている。植物ホルモンであるストリゴラクトン(SL)とエチレン(ET)がストライガの発芽において中心的に働くことが明らかにされており、被害低減への応用が期待されている。一方、ジベレリン(GA)は種子の発芽促進や休眠打破の効果を持つため、農業上よく用いられている植物ホルモンであるが、ストライガにおける作用については十分な追究が行われていない。我々はジベレリンもストライガ発芽を制御する機能を有すると考え、ストライガにおけるジベレリンの生理作用発現機構について研究した。本研究では、ジベレリンおよびジベレリン生合成阻害剤であるパクロブトラゾル(PAC)を用いて、ストライガの発芽率と茎の長さを測り、ジベレリンによる影響を調べた。ストライガの発芽における重要性が報告されているコンディショニングの期間とジベレリンの作用の関連についても確認することとした。また、ストライガの発芽促進作用をもつエチレンとジベレリンのクロストークについても調べた。ジベレリンはコンディショニング後の種子の発芽は促進しないが茎の伸長を促進した。一方で、コンディショニング前にジベレリンを投与することにより発芽率が上昇したが、この上昇効果はエチレン阻害剤である 1 －MCP 投与により阻害された。以上の結果より、ジベレリンはコンディショニング時にエチレンを介して休眠打破に関与していることが明らかになった。

Striga hermonthica, a kind of semi-parasitic plant which is also called ″witchweed″, usually parasitizes the roots of grains such as corn and rice and has caused great damage. The role of plant hormones like strigolactone (SL) and ethylene (ET) in germination of *Striga* have been well studied while the effects of another plant hormone gibberellin (GA) has not yet been elucidated. In this study, we measured the germination rates and stem lengths of *Striga* treated with gibberellin or its biosynthesis inhibitor paclobutrazol (PAC). We also focus on the period of conditioning since this period is important for *Striga* germination. Finally, cross-talk between gibberellin and ethylene in germination was also investigated.

Striga hermonthica, gibberellin, physiological functions

講演番号：3H02-08
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:30～ ミーティングルーム H

根寄生雑草防除に向けたジベレリン様活性化合物研究

Chemical and biological studies on GA agonists for controlling root parasitic weeds

○竹内 瑞穂、陳 嘉政、王 建文、高橋 郁夫、太田 鋼、下髙原 宏明、姜 凱、中村 英光、中嶋 正敏、浅見 忠男（東大農）
○Mizuho TAKEUCHI, Jiazheng CHEN, Jianwen WANG, Ikuo TAKAHASHI, Tsuyoshi OHTA, Hiroaki SHIMOTAKAHARA, Kai JIANG, Hidemitsu NAKAMURA, Masatoshi NAKAJIMA, Tadao ASAMI (Univ. of Tokyo)

ジベレリン（GA）は、種子発芽や茎部の成長促進、花芽形成などに関わる植物ホルモンであり、その制御技術は広く農業・園芸において用いられている。他方、所属の研究グループでは、GA がストリゴラクトン（SL）の生合成を抑制することで根部からの SL 分泌を減少させることを明らかにしている。この発見を応用することで、作物へ根寄生雑草が寄生することによる農作物生産への深刻な被害を低減できる。そこで、本研究では、GA アゴニストであることを確認した 67D および AC94377 の 2 種の化合物に焦点を当て、それらの構造展開と活性の相関を追究することで SL 生合成の抑制機能が高い化合物を選抜し、最終的には根寄生雑草被害低減効果に有用な新規化合物の発見を目指した。

合成した各類縁体について、植物を用いた生物検定系による評価法と、GA 受容体とその制御因子間の酵母 2–ハイブリッドアッセイ系（Y2H）を用いた評価法に供した結果、67D 類縁体群からは 67D-I を、AC94377 類縁体群からは AC94377 を候補化合物とした。これら候補化合物をイネに投与した結果、どちらの化合物もイネ根部における SL 放出抑制機能を有していると判断できた。

さらに、67D-I・AC94377 両化合物が構造的に似通った部位を持つことに着目し、そのハイブリッド構造をもつ新規化合物の創製とその GA 様活性に与える影響も調べており、合わせて報告したい。

Gibberellin (GA) is a phytohormone that regulates seed germination, stem elongation, and flowering. Recently, we found that GA inhibits strigolactone (SL) biosynthesis in the root of rice and consequently inhibits root parasitism of *Striga*. On the basis of these findings, this research aims to develop low-cost and high-active GA agonists. In this project, we focused on two GA agonists, 67D and AC94377, known as GA agonists by our previous works, and tried to find more effective chemicals as GA agonist by modifying the structure of them. Finally, we prepared several analogs derived from 67D and AC94377, and evaluated their activity as GA agonist with plants (rice and *Arabidopsis*) or the yeast assay systems. As the results of these evaluations, we selected 67D-I and AC94377 as potent candidates. We will discuss the plant- or receptor-specificities of them and the inhibition of SL exudation.

gibberellin, parasitic weeds, strigolactone

発表責任者：浅見　忠男（asami@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3H02-09
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:30～ ミーティングルーム H

円柱状のリンゴ樹形はジベレリンの欠乏が原因だった

The apple gene responsible for columnar tree shape reduces biologically active gibberellin

○中嶋 正敏[1]、渡辺 大智[1]、高橋 郁夫[1]、Jaroensanti-Takana Naiyanate[1]、宮崎 翔[1]、姜 凱[1]、中安 大[2]、和田 雅人[3]、浅見 忠男[1]、水谷 正治[2]、岡田 和馬[3] ([1]東大農、[2]神戸大農、[3]農研機構果樹茶部門)
○Masatoshi NAKAJIMA[1], Daichi WATANABE[1], Ikuo TAKAHASHI[1], Naiyanate Jaroensanti-Takana[1], Sho MIYAZAKI[1], Kai JIANG[1], Masaru NAKAYASU[2], Masato WADA[3], Tadao ASAMI[1], Masaharu MIZUTANI[2], Kazuma OKADA[3] ([1]Univ. of Tokyo, [2]Kobe Univ., [3]Institute of Fruit Tree and Tea Science, NARO)

リンゴの品種「ウイジック」は品種「マッキントッシュ」の突然変異体で，少ない側枝が立ち上がり，枝が太く，節間が短い特徴を持つ。円柱状の樹形となるこの形質はカラムナー性（円柱状性）と表現される。カラムナー性の樹形は，農産現場における整枝や剪定，収穫などの管理作業を省力化･低コスト化する上で，重要な形質と捉えられている。この「ウイジック」にカラムナー性をもたらす原因遺伝子は *MdDOX-Co* であると判明しているものの，その機能は未解明であった。本研究により，遺伝子産物 MdDOX-Co が植物ホルモン･ジベレリンの前駆体 GA_{12} を水酸化して GA_{111} に代謝する機能を持つことを明らかにした。これにより，前駆体 GA_{12} からジベレリンとしての生理活性を持つ活性型へ通じる本来の生合成過程，すなわち前駆体 GA_9 への代謝変換が行われにくい状況に変わっていることが理解できた。

シロイヌナズナにおいて *MdDOX-Co* 遺伝子を過剰発現させた個体は矮化することが知られていたが，MdDOX-Co 酵素の触媒反応により生産される GA_{111} がなぜシロイヌナズナの矮化に繋がるかは明らかでなかった。そこで，前駆体 GA_{12} と MdDOX-Co 代謝物 GA_{111} を用いて，シロイヌナズナ由来のジベレリン生合成酵素に対する反応性を比較した。その結果，GA 20-oxidase と呼ばれる酵素では，基質として GA_{12} を用いる場合と比べて GA_{111} を用いる場合の反応の進行がとても遅くなることを明らかにした。これにより，最終的に活性型ジベレリンへ至る生合成に停滞が生じ，それが *MdDOX-Co* 過剰発現体矮化の直接の原因であると結論した。シロイヌナズナを用いて今回明らかにしたこの結果がリンゴでも当てはまれば，「ウイジック」に特徴的な *MdDOX-Co* 遺伝子の発現様式と考え合わせることにより，カラムナー性付与機構の解明が期待される。

The ectopic expression of the gene *MdDOX-Co* is thought to result in apple trees with a columnar shape, but the mechanism is unknown. We found that *Arabidopsis* overexpressing *MdDOX-Co* becomes dwarf and the MdDOX-Co-hydroxylated biosynthetic precursor GA_{111} was very poorly metabolized by the gibberellin biosynthetic enzyme, GA 20-oxidase. We concluded that the ectopic metabolism of the gibberellin precursor by MdDOX-Co led to the depletion of bioactive gibberellin.

apple, columnar, gibberellin

発表責任者：中嶋 正敏（anakajm@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3H02-10
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:30～ ミーティングルーム H

エチレン様活性化合物が示すジベレリン様活性に関する考察

A discussion of the gibberellin-like activity of ethylene-like active compounds

○野村 明史、髙橋 郁夫、堅固山 裕子、水野 翼、財前 穂波、小山 倫之、竹内 瑞穂、浅見 忠男（東大農）
○ Akifumi NOMURA, Ikuo TAKAHASHI, Yuko KENGOYAMA, Tsubasa MIZUNO, Honami ZAIZEN, Tomoyuki KOYAMA, Mizuho TAKEUCHI, Tadao ASAMI (Tokyo Univ.)

チオウレア系化合物である Y21 は、低濃度(0.1 μM or 1 μM)においてジベレリン欠損体(*ga1-1*)シロイヌナズナの発芽を促進するとの実験結果に基づき、ジベレリン様活性を示す化合物として報告された(Yang et al. 2019)。この Y21 は当研究室の財前らによって合成された ZT8 や ZT22 といったエチレン様活性を持つ ZT 化合物と構造が似ていたこと、また Yang らの論文中の植物形態写真から Y21 が高濃度(100 μM)でエチレン活性を示していると判断できたことに加えて、一般的に発芽はエチレンでも促進されることから、Y21 がエチレン様活性を有する可能性があると考えた。暗所条件で生育させたシロイヌナズナの野生型体や ein2 変異体について Y21 処理による形態変化を観察したところ、Y21 はエチレン様活性を示すと判断できた。この事実は上述した Y21 の *ga1-1* の発芽促進活性が、エチレン様活性に起因することを示唆した。そこで当研究室でエチレン様活性化合物と報告した KUT15、ZT 化合物について、Y21 とあわせてこれら化合物が示す植物ホルモン活性がエチレン活性に起因することを確認することを目的として実験を行った。

We previously reported that ZT compounds, such as ZT8 and ZT22, showed ethylene-like activity. Recently Yang et al. reported that Y21, which has a similar structure to ZT compounds, showed gibberellin-like activity based on their germination promotive effect on *ga1-1*. To confirm whether ZT compounds show GA-like activity or Y21 show ethylene-like activity, we performed several physiological experiments and gene expression analyses. Finally we conclude that all of the chemicals described here selectively show ethylene-like activity both at high concentration and at low concentration.

ethylene, gibberellin, thiourea

講演番号：3H02-11
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:30～ ミーティングルーム H

植物のエチレン応答に対するシクロプロペン誘導体の影響

Effects of cyclopropene derivatives on plant ethylene responses

○小山 倫之、太田 鋼、浅見 忠男（東大農）
○Tomoyuki KOYAMA, Tsuyoshi OHTA, Tadao ASAMI (Univ. of Tokyo)

エチレンは種子発芽や実生の形態形成、花弁の老化、果実の成熟の促進、ストレス応答など植物の様々な成長段階に関わる植物ホルモンであり、エチレン作用阻害剤は青果や切り花の鮮度保持剤として利用される。実用化されているエチレン作用阻害剤にはチオ硫酸銀錯塩(STS)と 1-メチルシクロプロペン(1-MCP)があるが、前者は重金属を含有し、後者は気体であるため、圃場での利用には解決すべき課題がある。そこで本研究では、シクロプロペン骨格を持った液体または固体の性状を有する新規エチレン作用阻害剤を探索することを目指した。

種々のアルキンと種々のカルベンを反応させることでシクロプロペン誘導体を合成し、合成した化合物をエチレンの前駆体である 1-アミノシクロプロパンカルボン酸(ACC)とともにシロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)に投与した。ACC は植物によってエチレンに変換され、シロイヌナズナの暗所芽生えに三重応答を引き起こすが、エチレン作用阻害剤を同時に投与すると三重応答は抑制される。本研究では、この性質を用いて合成した化合物の活性を評価した。その結果、三重応答の内一部を抑制する化合物が複数見出された。

Ethylene is a plant hormone that promotes senescence of flower and ripening of fruits. Thus, ethylene action inhibitors can be applied as freshness retainers of flowers, vegetables, and fruits. Silver thiosulfate (STS) and 1-methylcyclopropene (1-MCP) have been put into practical use, but both agents have points to be improved in their use in fields. Therefore, to overcome their drawbacks, this research targeted the discovery of liquid or solid ethylene action inhibitors from cyclopropene derivatives.

Cyclopropene derivatives were synthesized from alkynes and carbenes, and treated to etiolated seedlings of *Arabidopsis thaliana* with 1-aminocyclopropene carboxylic acid (ACC), an ethylene precursor that is converted to ethylene in plants and induces so-called triple response to etiolated seedlings of Arabidopsis. Ethylene action inhibitors inhibit this response. Thus triple response is used as an indicator of inhibitory activity of our compounds in this research. Finally we found that some of the compounds had an activity to repress a part of triple response.

ethylene, cyclopropene, triple response

講演番号：3H02-12
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:30～ ミーティングルーム H

ハツカダイコン肥大根に含まれる天然変性タンパク質の精製と凍結保護活性に関する研究

A study on purification and cryoprotective activity of intrinsically disordered protein from radish taproots.

○大須田 穂波[1]、原 正和[1,2] ([1]静岡大農、[2]静岡大グリーン研)
○Honami OSUDA[1], Masakazu HARA[1,2] ([1]Shizuoka Univ., [2]Research Institute of Green Science and Technology, Shizuoka Univ.)

【背景】天然変性タンパク質（Intrinsically disordered proteins, IDPs）は、定常状態で特定の二次構造をとらないタンパク質である。当研究室では凍結保護活性を示す植物 IDPs について調査しており、ハツカダイコン(*Raphanus sativus* L.)肥大根の可溶性画分に高い活性があることを見出した。
【結果・考察】ハツカダイコン肥大根から回収した熱安定性タンパク質画分を 2 つの陰イオン交換クロマトグラフィーによって精製し、マススペクトルにより RVCaB と同定した。RVCaB はハツカダイコンの液胞膜に存在し、液胞におけるカルシウム貯蔵に関与する IDP であることが知られている。RVCaB における乳酸脱水素酵素（LDH）の凍結失活抑制活性は一般的な凍結保護剤よりもはるかに高かった。RVCaB を構成するアミノ酸配列を 15 アミノ酸ずつに分割したセグメント（Seg01～15）の凍結保護活性を調査した結果、Seg03 に最も強い活性が見られた。Seg03 は疎水性を示す傾向にあることから、RVCaB は疎水性相互作用によって LDH の凍結失活を抑制していると考えられる。

Introduction: Intrinsically disordered proteins (IDPs) are proteins that do not have a specific secondary structure in the steady state. In our laboratory, plant IDPs showing cryoprotective activities have been investigated. We found that the soluble fraction of radish (*Raphanus sativus* L.) taproot has high cryoprotective activity.

Results and discussion: We purified a cryoprotective protein from the heat-stable protein fraction of radish taproot by using two anion exchange chromatographies. The mass spectrum analysis indicated that the purified protein was RVCaB. RVCaB is known to be an IDP that is present in the vacuolar lumen of radish and is involved in the storage of calcium in vacuoles. The cryoprotective activity for lactate dehydrogenase (LDH, a model of cryo-sensitive enzyme) of RVCaB was much higher than those of general cryoprotectants. We divided the amino acid sequence of RVCaB into 15 segments (Seg01 to 15, 15 amino acids each), and determined the cryoprotective activities, finding that Seg03 showed the highest activity. Since Seg03 tended to be hydrophobic, RVCaB reduced the cryodamage of LDH via the hydrophobic interaction.

intrinsically disordered protein, RVCaB, cryoprotection

発表責任者：原正和（hara.masakazu@shizuoka.ac.jp）

講演番号：3H02-13
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:30～ ミーティングルーム H

デハイドリンセグメントによるリポソームの凍結凝集抑制に関する研究

A study on the inhibition of liposome cryoaggregation by dehydrin segments

○木村 友紀[1]、大久保 智博[2]、清水 広介[4]、間賀田 泰寛[4]、朴 龍洙[1,3]、原 正和[1,3]([1]静岡大農、[2]静大院農、[3]静岡大グリーン研、[4]浜松医大光尖端医学教育研セ)
○ Yuki KIMURA[1], Tomohiro OHKUBO[2], Kosuke SHIMIZU[4], Yasuhiro MAGATA[4], Enoch Y. PARK[1,3], Masakazu HARA[1,3] ([1]Shizuoka Univ., [2]Graduate School of Science and Technology, Shizuoka Univ., [3]Research Institute of Green Science and Technology, Shizuoka Univ., [4]Preeminent Medical Photonics Education & Research Center, Hamamatsu University School of Medicine)

【背景】デハイドリンは種子の保存性や低温耐性に関与する植物固有の LEA（late embryogenesis abundant）タンパク質であり、低温耐性に関連した様々な機能が調べられてきた。デハイドリンとリン脂質を用いたリポソームとの様々な相互作用が研究されているが、デハイドリンによるリポソームの凍結保護に関する研究は少ない。本研究ではリポソームの凍結凝集実験系を確立し、デハイドリンがリポソームの凍結凝集を阻止するかを調査した。
【結果と考察】シロイヌナズナのデハイドリン AtHIRD11 はリポソームの凍結凝集を阻害した。AtHIRD11 の凍結保護領域を決定するために、AtHIRD11 をセグメントに分割した。その結果、デハイドリンの保存配列である K セグメントがリポソームの凍結凝集を抑制したが、それ以外のセグメントには抑制活性は見られなかった。変異導入解析により、K セグメントの凍結保護活性には疎水性のみならず、荷電アミノ酸の適切な存在バランスが必要であることが分かった。さらに、K セグメントはリポソームに結合しないことが確認されたため、疎水性引力と静電引力による非結合性な会合が K セグメントの凍結保護活性に関与すると示唆される。

Introduction: Dehydrin is a plant-specific LEA (late embryogenesis abundant) protein which is involved in seed storage and cold tolerance of plants. The various functions related to cold tolerance have been investigated. Although the interactions between dehydrins and liposomes consisting of phospholipids have been studied, there are few reports regarding the cryoprotection of liposomes by dehydrins. In this study, we established the experimental system of liposome cryoaggregation, and assessed whether dehydrin inhibited the liposome cryoaggregation.

Results and Discussion: *Arabidopsis* dehydrin AtHIRD11 inhibited the cryoaggregation of liposomes. In order to determine the cryoprotective regions of AtHIRD11, we divided the amino acid sequence of AtHIRD11 into segments. As a result, K-segment which is conserved in dehydrins inhibited the liposome cryoaggregation, but other segments did not. Mutation analysis indicated that not only hydrophobicity but also appropriate balance in the existence of charged amino acids were required for the cryoprotective activity of K-segment. Since K-segment did not bind to liposomes, it is suggested that the unbound association via hydrophobic and electrostatic attractions might be related to the cryoprotective activity of the segment.

liposome, dehyrin, cryoprotection

発表責任者：原正和（hara.masakazu@shizuoka.ac.jp）

講演番号：3H02-14
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:30～ ミーティングルーム H

沈水植物の成長と繁殖に関わる底質の成分解析

Analysis of sediment components associated with growth and reproduction of submerged plant

○梶原 尚之、荒木 希和子、久保 幹（立命館大生命）
○Naoyuki KAJIWARA, Kiwako S. ARAKI, Motoki KUBO (Ritsumeikan Univ.)

沈水植物は、光合成による溶存酸素濃度の増加、根圏分泌物による底質微生物の活性化など、水圏生態系において重要な役割を担っている。沈水植物の生育には底質の栄養組成が影響を与えると考えられるが、十分な知見が得られていない。本研究では異なる栄養組成の底質で沈水植物の栽培実験を行い、成長及び繁殖度合いを比較した。底質 4 種類を使用し、シュートを 10 cm に調整したバリスネリア・スピラリス（*Vallisneria spiralis*）15 株を植え、室温 23℃、12 時間ごとの明暗周期の植物生育室で 30 日間栽培した。TN と TK が最も少ない底質ではどの株もランナーを伸長せず、子株も存在しなかった。TN が多いほどランナー伸長および子株形成した株数が増加し、TN：1,700 mg / kg ではランナー伸長 13 株、そのうち 12 株が子株を形成した。以上から沈水植物の繁殖は底質 TN に影響すると考えられた。陸上植物においても一例として、土壌 TN によってクローン繁殖に差が生じることがわかっている。このことから、沈水植物と陸上植物のクローン繁殖には共通して底質および土壌中の TN が重要であることが明らかとなり、底質では 490 mg/kg 以上の TN が必要であると考えられた。

Submerged plants play important roles in aquatic ecosystems, such as increasing dissolved oxygen concentrations through photosynthesis and activating sediment microbes through rhizospheric secretions. The nutrient composition of sediments may affect the growth of submerged plants, but sufficient knowledge has not been obtained. This study, submerged plants were grown in sediments with different nutrient compositions, and their growth and reproduction rates were compared. Using 4 kinds of sediments, 10 cm shoots of 15 strains of *Vallisneria spiralis* were planted and cultivated in a plant growth room at 23 ° C for 12 hours with a light/dark cycle for 30 days. None of the strains grew runners in sediments with the lowest TN and TK, and no progeny were present. The higher the TN, the longer the runners and the greater the number of strains that formed progeny. At TN 1,700 mg/kg, the longer runners were 13 strains, of which 12 strains formed progeny. These results suggest that the reproduction of submerged plants affects sediment TN. In land plants, soil TN has been shown to cause differences in clonal reproduction. These results indicate that TN in sediment and soil is important for clonal reproduction of submerged and terrestrial plants, and TN 490 mg/kg or more is necessary for sediment.

submerged plant, sediment components, clonal reproduction

発表責任者：梶原尚之（sb0062ir@ed.ritsumei.ac.jp）

講演番号：3H02-15
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:30～ ミーティングルーム H

硫黄欠乏下で発現が上昇する ERF 転写因子の機能解析

Functional analysis of a ERF transcription factor responsible for sulfur deficiency

○門脇 佑樹、丸山 明子（九州大農）
○Yuki KADOWAKI, Akiko MARUYAMA (Kyushu Univ.)

硫黄は動植物の必須元素である。植物は、ヒトを含む動物と異なり、硫酸イオンを還元し、システインを始めとする含硫有機化合物を生合成するため、生態系の硫黄循環に重要な役割を果たす。植物が硫黄不足(－S)に陥ると、植物体内では硫黄同化の促進、含硫二次代謝物質の生合成抑制と分解促進が起こる。これらの－S 応答を包括的に担う転写因子が Sulfur LIMitation1(SLIM1)である。SLIM1 は、エチレン応答の制御因子 Ethylene Insensitive3 (EIN3)と同じく EIL 転写因子の一つである。EIN3 は、エチレンに応じて ERF 転写因子の発現を誘導することで種々のエチレンに応じた表現型をもたらす。SLIM1 の下流でも ERF 転写因子が働く可能性を考え、－S により発現が上昇する ERF 転写因子の解析を行った。

野生型株では－S で遺伝子発現が上昇し、*slim1* 変異株では上昇しない ERF 転写因子として ORA59 を見出した。ORA59 の欠損株(ORA59KO)を硫黄十分(+S)、－S 下で育成し、－S 応答遺伝子の発現量、システイン(Cys)量やグルタチオン(GSH)量を測定した。その結果、+S 下で ORA59KO 株の Cys 量が野生型株よりも低くなり、GSH 量も同様に変化した。一方、－S 下では逆にこれらの量が増加した。生重量も同様に変化した。これらの結果から、ORA59 が－S への応答に働くと考えている。

Sulfur (S) is an essential element for all organisms. Plants play crucial roles in the global S cycle by reducing oxidized S, sulfate, and biosynthesize various S-containing organic compounds such as cysteine. When plants suffer from S deficiency (−S), plants stimulate S assimilation and the catabolism of S-containing secondary metabolites, and repress S-containing secondary metabolites' biosynthesis. Sulfur LIMitation 1 (SLIM1) is the transcription factor responsible for these −S responses, belonging to the EIL family. From the fact that EIN3, a representative EIL family member, induces the expression of *ERF* transcription factors, we postulated that any ERF transcription factors can be involved in the −S responses downstream of SLIM1.

We found that *ORA59*, an ERF transcription factor, is up-regulated by −S in the wild-type plants (WT) but not in *slim1* mutants. WT and the disruption line of ORA59 (ORA59KO) were grown under S-sufficient (+S) and −S conditions. Then we analyzed −S-responsive gene expression, cysteine (Cys), and glutathione (GSH) levels. Under +S, the Cys and GSH levels in ORA59KO were lower than those in WT, whereas these were higher in ORA59KO than in WT under −S. These results indicated that ORA59 might participate in −S responses in plants.

ERF transcription factor, Sulfur deficiency

講演番号：3H02-16
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:30～ ミーティングルーム H

植物の硫黄栄養応答における硫酸イオン輸送体 SULTR1;2 と転写因子 SLIM1 のつながり

Relation between sulfate transporter SULTR1;2 and SLIM1 transcription factor in plant responses to sulfur nutrition

○松尾 翔大、丸山 明子 (九州大農)
○Shodai MATSUO, Akiko MARUYAMA (Kyushu Univ.)

植物は硫黄(S)を硫酸イオンとして吸収し、含硫有機物を生合成する。植物が S 不足(−S)に晒されると、転写因子 Sulfur Limitation1(SLIM1)が働き、硫酸同化や含硫二次代謝物質グルコシノレート分解が促進されるとともにグルコシノレート生合成が抑制される。逆に環境中の硫酸イオンが増加すると、BGLU28 等の−S 誘導性遺伝子の発現は抑制される。この抑制が根からの吸収を担う硫酸イオン輸送体 SULTR1;2 を介した硫酸イオン受容によることが報告されているが、SULTR1;2、SLIM1 間の情報伝達上の関係性は不明である。本研究では、SULTR1;2、SLIM1 の欠損株を用いて硫黄栄養条件に応じた BGLU28 の発現を調べる事により、両者の情報伝達上の繋がりについて示唆を得た。

シロイヌナズナの野生型株(WT)、SULTR1;2 欠損株(12KO)、SLIM1 欠損株(SKO)を＋S、−S 培地で 10 日間育成後、新しい＋S、−S 培地へ移し替え、0、8、24 時間後に地上部と根に分けて採取した。根を用いて−S 応答遺伝子の発現量を、地上部を用いて代謝物量を測定した。+S から−S への移動により、WT では BGLU28 の発現が上昇したが、SKO、12KO ではその程度が低下したことから、SULTR1;2 が SLIM1 への−S 情報の伝達を担うことが示唆された。−S から＋S への移動では、BGLU28 の減少率が 12KO で WT、SKO より有意に低く、＋S に応じた BGLU28 の減少に SULTR1;2 は寄与するが、SLIM1 は主要な役割を果たさないことが示唆された。

Plants absorb sulfur (S) as sulfate and assimilate it into organic S metabolites. Sulfur Limitation 1 (SLIM1) is known as a central transcription factor coordinating the −S responses. Besides, Sulfate Transporter (SULTR) 1;2 works as a sulfate receptor which down-regulates −S-induced gene expressions like *BGLU28* under S sufficiency (+S). However, the relation between SULTR1;2 and SLIM1 in the S-responsive signaling pathway is not clarified. In this study, we analyzed the *BGLU28* expressions in the wild-type plants (WT) and the disruption lines of SLIM1 (SKO) and SULTR1;2 (12KO) under different S conditions to get insight about their contribution to plant sulfur responses.

Plants were grown on + S and −S medium for ten days and then transferred to another + S and −S medium. After 0, 8, and 24 hours of transfer, we analyzed *BGLU28* expression and sulfate levels in plants. Upon transfer from +S to −S, induction of *BGLU28* was lower in SKO and 12KO than that in WT, suggesting that SULTR1;2 mediated −S signal to SLIM1. Upon the transfer from −S to +S, *BGLU28* levels were similarly decreased in WT and SKO, and the response was lowered in 12KO. These results suggested SLIM1 did not mediate the +S signal.

sulfate transporter, SULTR1;2, SLIM1 transcription factor

講演番号：3H02-17
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:30～ ミーティングルーム H

植物免疫抑制剤 NAS1 誘導体が病害抵抗性に及ぼす影響の解析

Analysis of mechanism of plant immunosuppressant NAS1

○草島 美幸、青木 智史、高橋 郁夫、姜 凱、中村 英光、浅見 忠男（東大院農）
○Miyuki KUSAJIMA, Satoshi AOKI, Ikuo TAKAHASHI, Kai JIANG, Hidemitsu NAKAMURA, Tadao ASAMI (Univ. Tokyo)

病原菌感染時の植物にサリチル酸（SA）を介して誘導される全身獲得抵抗性（SAR）は、様々な病原体に対して効果を発揮する免疫機構の一つである。SAR の誘導機構および誘導剤は農薬開発を目的として多くの研究が行われてきたが、抑制剤に関する報告は少ない。植物の免疫抑制剤の選抜および作用機構の解明は、植物免疫機構の更なる理解に繋がると同時に、植物と有用微生物の相互作用促進に寄与することが考えられる。本研究では、新たに選抜した免疫抑制剤 NAS1 と誘導体を用いて植物の病害抵抗性に及ぼす影響を解析した。
免疫抑制剤 NAS1 含有 1/2MS 培地にシロイヌナズナを播種し、10 日後に SA 噴霧処理して解析に用いた。シロイヌナズナを育苗培土に播種し、免疫抑制剤 NAS1 の処理 3 日後に炭疽病菌の接種試験を行った。
NAS1 はベンゾイミダゾール、ケトニトリル、フラン環からなる化合物であり、各部分の構造変換体について合成と活性を検討した。また、NAS1 誘導体単独処理時の遺伝子発現を解析した結果、NAS1 およびベンゾイミダゾールとケトニトリル構造を持つ誘導体の中には病害抵抗性マーカー遺伝子 *PR1* の発現を強く抑制する化合物が見出された。これらの結果より、NAS1 の作用にはベンゾイミダゾール、ケトニトリル構造が重要であり、フラン環部分の構造が活性の強度に影響することが示唆された。これらの化合物が病害抵抗性に及ぼす影響の解析を進めている。

本研究は農研機構生研支援センター「イノベーション創出強化研究推進事業」の支援を受けて行った。

Systemic acquired resistance (SAR), induced through Salicylic acid (SA)-mediated signaling pathway, is effective for protecting plants from various types of diseases. SAR have been practically used in rice field by exploiting chemicals, so called plant activators. SAR is an immune system unique to plants. However, there are few reports of compounds that suppress plant immunity. To analyze the mechanisms both of suppression and of SAR in model plants, we established assay systems in Arabidopsis and rice. Finally, we found that plant immunosuppressant NAS1 suppresses the SA pathway.

Arabidopsis, salicylic acid, disease resistance

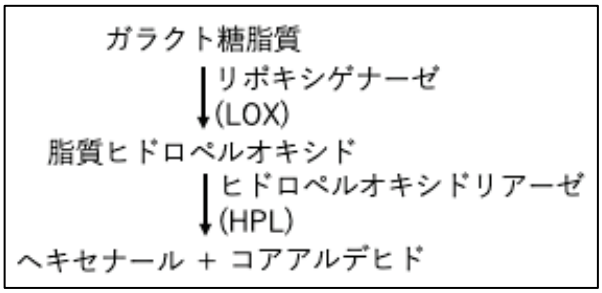
発表責任者：浅見忠男（asami@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3H04-01
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:30～ ミーティングルーム H

植物葉を傷つけるとみどりの香りを急激に生成する仕組みは進化過程でいつどのように獲得されたのか？

When and how plants acquired the ability to form green leaf volatiles upon tissue damage?

田中 萌菜、太田黒 百音、肥塚 崇男、○松井 健二（山口大農）
Moena Tanaka, Mone Otaguro, Takao Koeduka, ○Kenji Matsui (Yamaguchi Univ.)



◆みどりの香りはヘキセナールなど炭素数 6 の揮発性化合物の総称で、植物組織が傷つくと数秒以内に主に葉緑体ガラクト糖脂質からリポキシゲナーゼによる酸素添加と引き続くヒドロペルオキシドリアーゼ（HPL）による開裂反応を経て急激に生成される。種子植物のほぼ全てがみどりの香り生成能を有するがこうした機能が植物進化過程のいつどのようにして獲得されたのかは明らかでない。そこで、コケ植物、小葉類、シダ類を中心に傷害によるみどりの香り生成能を調査した。◆タイ類ゼニゴケ葉状体に傷害を与えるとセスキテルペン類が急激に生成されたが、みどりの香り生成は認められなかった。一方、オオミズゴケなど一部のセン類では弱いながらもみどりの香り生成能が認められた。イワヒバ、スギナなどでは被子植物と同程度のみどりの香り生成能力が確認できた。こうしたことからセン類、小葉類が分岐した頃にみどりの香りバースト能力が獲得されたと考えられる。小葉類イヌカタヒバには 11 個の HPL 様遺伝子があり、その一つが HPL をコードしていると考えられる。みどりの香り生成能獲得のためには HPL 遺伝子の獲得が必須であったと考え、現在その機能解明を進めている。

◆Green leaf volatiles (GLVs) consist of six-carbon volatile compounds and are formed rapidly when plant leaves would be damaged. GLVs are formed from galactolipids through oxygenation by lipoxygenase and subsequent cleavage reaction catalyzed by hydroperoxide lyase (HPL). Most terrestrial plants have the ability to form GLVs upon mechanical damage, but it is not known when and how the ability was acquired in the course of the evolution of terrestrial plants. ◆When thalli of a liverwort (*Marchantia polymorpha*) were damaged, emission of sesquiterpenes was observed, but the emission of GLVs was negligible. Not all, but some mosses, such as *Sphagnum*, showed week but substantial ability to form GLVs after mechanical damage. Most lycophytes examined so far showed the ability comparable to those found with angiosperms. With a lycophyte, *Selaginella moellendorffii*, 11 genes showing homology to angiosperm HPL were found. We are now trying to identify HPL gene in the lycophytes in order to show that the acquisition of HPL gene was the essential event to acquire the ability to form GLVs upon wounding.

Green leaf volatiles, Hydroperoxide lyase, Lipoxygenase

発表責任者：松井健二（matsui@yamaguchi-u.ac.jp）

講演番号：3H04-02
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:30～ ミーティングルーム H

コーヒーの芳香成分：テルペン類蓄積に関わる配糖化酵素の探索と機能解析

Isolation and characterization of terpenoid UDP-Glc glycosyltransferases from *Coffea arabica*

○井田 美帆、能代 志歩、水野 幸一（秋田県大生物資源）
○Miho Ida, Shiho Noshiro, Kouichi Mizuno (Akita Prefectural Univ.)

［背景・目的］ コーヒー豆の優劣を決める重要なファクターの一つとして、特有の芳香がある。その芳香の主成分であるリナロールは揮発性の化合物で、モノテルペンアルコールの一種である。植物中でリナロールは通常配糖体として蓄積しており、この配糖化は UDP-グルコース グリコシルトランスフェラーゼ（UGTs）が触媒する。リナロール配糖体は、コーヒー豆の焙煎で糖との結合が切断されることで揮発性のリナロールとなり、芳香として空気中に放出される。リナロールの配糖化を担う *UGT* 遺伝子の単離・機能解析を行うことで、テルペンのような揮発性物質の植物体内における蓄積メカニズムを明らかにし、将来的には付加価値の高い、香り豊かなコーヒーの開発に繋げられるのではないかと期待している。本研究では、アラビカコーヒー（*Coffea arabica*）を材料として、リナロールを主としたテルペン類配糖化に関わる *UGT* 遺伝子の単離同定を試みた。
［方法］ チャ（*Camellia sinensis*）から単離されたゲラニオール配糖化酵素 UGT85K11 の塩基配列をもとに、*C. arabica* の配列情報に対して *in silico* スクリーニングを行い、候補となる *UGT* 遺伝子の塩基配列およびアミノ酸配列を得た。最終的に 6 種の *UGT* 遺伝子（*Ca4*、*Ca5*、*Ca10*、*Ca14*、*Ca15* および *Ca20*）を選抜し、これらの遺伝子を RT-PCR にて単離し、大腸菌組換え型酵素を用いた機能解析を試みた。
［結果と考察］ 6 種の候補遺伝子のうち、*C. arabica* の若葉から 4（*Ca4*、*Ca5*、*Ca10* および *Ca14*）、つぼみから 1（*Ca15*）種類の遺伝子の単離に成功した。これらの組換え型酵素の生産を試み、活性を調べたところ、Ca14 は今回用いた基質には活性を示さなかったものの、Ca5 はペリリルアルコール、テルピネオール、ゲラニオールに、Ca10 はリナロール、シトロネロール、ペリリルアルコール、テルピネオールに活性を示した。Ca4 および Ca15 は現在組換え型酵素の生産に取り組んでいる。今後はリナロールに対して活性を示した Ca10 について、詳細な機能解析を行う予定である。

The aroma is important to decide the value of coffee beans. Linalool, which is one of the volatile terpene compounds, is dominant in the coffee aroma. Since terpenoids are generally accumulated as glycosides, the glycosylation is catalyzed by the UDP-glucose glycosyltransferases (UGTs). In this study, we identified those *UGT* genes from *Coffea arabica* and analyzed them with recombinant enzymes. Here, we report the isolation and characterization of an enzyme that has activity towards linalool.

Coffee, Terpene, Aroma

発表責任者：水野　幸一（koumno@akita-pu.ac.jp）

講演番号：3H04-03
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:30～ ミーティングルーム H

原種コーヒー*C. pseudozanguebariae* カフェイン生合成系酵素の機能解析およびその基質特異性決定部位の探索

Mutational analysis of theobromine synthase from wild coffee, *C. pseudozanguebariae*.

國久 葉月[1]、井田 美帆[1]、岩根 利奈[1]、ポンセット バレリー[2]、デコック アレキサンダー[2]、○水野幸一[1] ([1]秋田県大生物資源、[2]IRD-DIADE)
Hadsuki KUNIHISA[1], Miho IDA[1], Rina IWANE[1], Valerie Poncet[2], Alexandre de Kochko[2], ○Kouichi MIZUNO[1] ([1]Akita Prefectural Univ., [2]IRD-DIADE)

［背景・目的］ *Coffea* 属原種はそれぞれカフェイン含量が異なる。それらのカフェイン生合成系酵素群を調べることで、*Coffea* 属が如何にしてカフェイン合成能が獲得され発展してきたのか、その分子進化を探っている。これまでに、カフェイン含量がきわめて低い *C. pseudozanguebariae* から新奇テオブロミンシンターゼ *Cps-TS1* を単離した。Cps-TS1 は、7-methylxanthine の 3*N* および Theobromine の 1*N* メチル化を担う CCS1 と 90.6 %の非常に高い相同性を示すものの、1*N* メチル化活性を持たない。そこで、変異型 Cps-TS1 を作製し活性を調べることにより、CCS1 の基質特異性決定部位の探索を試みた。今回は、Cps-TS1 のより詳細な機能解析と、変異型酵素の活性試験の結果を報告する。
［方法］Cps-TS1 について、その組換え型酵素を 7-methylxanthine を基質として、Tris/HCl pH 8.0、30℃で 10 分間反応させ、生成物を液体シンチレーションカウンターにて検出し、K_m 値を算出した。一方、*Cps-TS1* に部位特異的変異を導入するためのプライマーを設計し、PCR にて変異型を得た。これらについて大腸菌を用いた発現系を構築し、得られた組換え型酵素を用い、カフェイン前駆体であるキサンチン誘導体群を基質として反応させ、TLC にて生成物を検出し活性を調べた。
［結果・考察］ Cps-TS1 の 7-methylxanthine に対する K_m 値を調べたところ、142 μmol/L であった。つぎに Cps-TS1 と *C. racemosa* から単離した同系統のテオブロミンシンターゼ Cra-TS2、*C. arabica* のカフェイン・テオブロミンシンターゼ CCS1 および CTS1 とのアミノ酸配列の比較より、1*N* メチル化活性に寄与するアミノ酸残基を推定し、それらを置換した Cps-TS1 の変異型酵素を作製し活性試験を行った。その結果、N369D は Theobromine に対して弱いながら 1*N* メチル化活性を示した。一方、L328V は野生型と同様 1*N* メチル化活性は示さなかったものの、Paraxanthine に対する 3*N* メチル化活性が著しく低下することを見いだした。以上より、相当する CCS1 の D369 は 1*N*、Cps-TS1 の L328 は 3*N* メチル化の基質特異性に関与することが示唆された。現在、更なる変異型酵素の機能解析を進めている。

The novel theobromine synthase *Cps-TS1* was isolated from *C. pseudozanguebariae* that is an extremely low caffeine content species. To clarify the amino acid residues for substrate specificity of the enzyme, we constructed and analyzed Cps-TS1 mutants. Cps-TS1 N369D showed weak 1*N*-methylation activity with theobromine. Cps-TS1 L328V significantly reduced 3*N*-methylation activity with paraxanthine. Therefore, it was suggested that D369 of the corresponding CCS1 is involved in the 1*N*-methylation and that L328 of Cps-TS1 is essential to 3*N*-methylation.

coffee, caffeine, methyltransferase

発表責任者：水野幸一（koumno@akita-pu.ac.jp）

講演番号：3H04-04
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:30～ ミーティングルーム H

オオムギにおけるグラミン生合成の解析

Insight of the gramine biosynthesis in barley

○石川 恵里加、金井 詞音、須恵 雅之（東京農大・農化）
○Erika Ishikawa, Shion Kanai, Masayuki Sue (Tokyo Univ. Agric.)

オオムギの一部栽培品種は、グラミンを耐病性化合物として生産・蓄積している。放射性同位体標識化合物を用いた研究により、グラミンの生合成経路としては、まず、トリプトファン(Trp)からアミノメチルインドール(AMI)が合成され、さらに 2 段階の *N*-メチル基転移反応を経て生成すると推測されている。この中で、Trp から AMI への変換過程では、インドール環とアミノ基の間の 2 つの炭素原子のうちの 1 つが除去されるというユニークな反応が起こっているが、その機構は未だ明らかとなっていない。そこで本研究では、Trp の構成原子がどのようにグラミンに取り込まれるかを解析することで、グラミン生合成経路に関する知見を得ることを目的とした。まず、種々のオオムギ品種に含まれる Trp やグラミンなどのインドール化合物類を LC/MS で分析し、その蓄積量を生育時期・部位ごとに評価した。その結果、グラミン蓄積は葉身のみに見られ、栽培期間との相関は見られなかった。続いて、^{13}C および ^{15}N で標識した種々の Trp を用いたトレーサー試験を行い、各同位体がグラミンにどのように保持されるかを解析した。その結果、炭素原子については、インドール環と側鎖のβ炭素はグラミンに保持されるが、α炭素は保持されなかった。さらに窒素原子については、インドール環と側鎖アミノ基の窒素がともに保持されたことから、アミノ基の遊離を伴わないα炭素の除去が行われていることが示され、新規の反応が起きている可能性が示唆された。

Some barley cultivars accumulate an alkaloid, gramine, as a defense compound against pathogens and insects. Gramine is considered to be biosynthesized from tryptophan (Trp) via aminomethylindole (AMI) followed by two sequential *N*-methylation reactions. However, the pathway from Trp into AMI has not been elucidated. In the present study, indole-related compounds including Trp and gramine were quantified in various barley cultivars by LC/MS. The results demonstrated that gramine was accumulated only in the leaf. When Trp labeled with ^{13}C or ^{15}N at various positions was fed to barley, it was shown that the α carbon was eliminated during the conversion from Trp to gramine while the indole ring and the β carbon were retained. Furthermore, it was revealed that the nitrogen atom in the amino group of Trp was maintained through the gramine biosynthesis. These results indicated that a novel reaction that eliminates the α carbon without release of the amino group would be included in the conversion of Trp into AMI.

barley, biosynthesis, indole alkaloid

発表責任者：須恵雅之（sue@nodai.ac.jp）

講演番号：3H04-05
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:30～ ミーティングルーム H

オオムギにおけるグラミン生合成遺伝子の探索
Investigation of genes for gramine biosynthesis in barley

○金井 詞音、石川 恵里加、須恵 雅之（東京農大・農化）
○Shion KANAI, Erika ISHIKAWA, Masayuki SUE (Tokyo Univ. Agric.)

【目的】グラミン(Grm)はオオムギが産生するインドールアルカロイドであり、アブラムシに対して毒性を示すことから、耐病性化合物としての役割がある。また Grm は Trp を出発物質として、3-アミノメチルインドール(AMI)を経て生合成されることが知られている。Trp から AMI へと代謝される過程において、インドール環-アミノ基間で二つの炭素原子のうち一つが失われるという興味深い反応が起こっている。しかしこの過程に関する酵素や遺伝子は未だ特定されておらず、どのような中間体を経ているのかも解明されていない。本研究では Trp から AMI の変換の過程を明らかにすることを目的とした。
【方法・結果】生合成遺伝子を探索するにあたって、まず、Grm 生産品種(ファイバースノウ)と非生産品種(Morex)を用いた RNA-seq による網羅的解析を行った。その結果、ファイバースノウで多く発現し、酵素をコードする遺伝子が 252 遺伝子得られた。次に、各候補遺伝子の機能解析を行うために、AMI から Grm の変換を触媒する *HvNMT* と共にシロイヌナズナへ導入した。得られた各形質転換体を LC/MS 分析したところ、そのうちの一つに、保持時間、MS、UV スペクトルより Grm と思われるインドール化合物の生産が見られた。

Gramine (Grm) is an indole alkaloid in barley. Since it exhibits toxicity to pathogens and insects such as aphids, it is considered to play a role as disease resistance compound. Grm is biosynthesized from Trp via 3-aminometylindole (AMI). The process includes a notable reaction in which one of th two carbon atoms between the indole ring and the amino group is removed. However, not only the enzymes and genes but also the intermediates involved in the process have not been identified. In this study, we aimed to reveal the process in the Grm biosynthesis.

To explore the biosynthetic gene, RNA-seq was conducted using two barley cultivars, Fibersnow (Grm productive) and Morex (non-productive). As the results, 252 genes encoding enzymes were shown to be expressed at higher level in Fibersnow than in Morex. Then, to analyze the function of each candidate gene, each of them was transformed to *Arabidopsis thaliana* along with *HvNMT* which is responsible to the conversion of AMI to Grm. The plants over expressing one of the gene were shown to produce an indole compound corresponding to Grm based on LC/MS analysis.

barley, biosynthesis, indole alkaloid

発表責任者：須恵雅之（sue@nodai.ac.jp）

講演番号：3H04-06
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:30～ ミーティングルーム H

ブラシノステロイド様活性化合物の新規活性評価系の構築

Development of a novel bioassay system for brassinolide-like compounds

○西川 文太、瀧本 征佑、中川 好秋、宮川 恒（京都大学）
○BUNTA NISHIKAWA, SEISUKE TAKIMOTO, YOSHIAKI NAKAGAWA, HISASHI MIYAGAWA (Kyoto Univ.)

[目的]ブラシノライド(BL)を代表とするブラシノステロイド(BR)は,極微量で植物の伸長成長や細胞分裂促進などの活性を示すことから,植物成長調節剤としての農業利用が期待できる。しかしBRのステロイド構造に由来する高い合成コストが利用の障壁となっている。これまで当研究室では BR の構造の単純化を目的として非ステロイド型アゴニストのインシリコスクリーニング探索を行ってきた。新規化合物の探索において最も重要となるのは,定量的な活性評価系である。これまで,BRのアゴニスト活性を評価するアッセイ系として,イネラミナジョイント法やシロイヌナズナやインゲンの胚軸伸長試験が報告されているが,いずれの方法も,操作が煩雑で結果が出るまでに1週間以上の日数がかかることが問題である。そこで,本研究では,より簡単に短期間でアゴニスト活性を定量的に評価できるアッセイ系を構築することにした。
[方法]２～３日間流水中で発芽させたコシヒカリ種子を 10～20 粒 50ml 容ビーカー内に並べ,そこに供試化合物を含む水溶液を加えた。２日後根の形態を観察した。なお,供試化合物には先行研究にて活性が評価されている複数の既知化合物を用いた。
[結果および考察]BR 処理によって,イネの根が螺旋状に変化することが確認できた。螺旋状の根が表れる限界の濃度を最小効果モル濃度(MEC)と決定し,この逆対数値である pMEC を活性の指標としたところ,これまでに報告されているBRにおいて再現性よく pMEC を求めることができた。また,これまでにイネラミナジョイント法を用いて求めた BR の活性(pED_{50})と比較し,両者の間に良好な直線関係が認められた。このアッセイ系はBRのアゴニスト活性を評価するうえで有用であると考えられる。

Brassinosteroids (BRs) such as brassinolide (BL) and castasterone (CS) are plant steroid hormones that are essential for plant growth and, which can be used effectively as pesticides.

Previously we synthesized BL and CS analogs and measured their hormonal activity using rice lamina inclination assay. The activity was quantitatively determined as the reciprocal logarithmic value of 50% effective dose (pED_{50}, mol/plant). In this study a novel bioassay system for BRs was constructed, in which the root morphology was observed after 48hrs. Germinated rice seeds were incubated at 25ºC in water containing test compounds. The shape of the roots changed to a spiral by treating at a low concentration of BL (1.5 nM). The minimum effective concentration (MEC) that induce the spiral shape in root was determined, and the reciprocal logarithm of MEC (pMEC) was used as the activity of BRs.

brassinosteroid, brassinolide, oryza sativa

発表責任者：西川文太（nishikawa.bunta.76x@st.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3H04-07
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:30～ ミーティングルーム H

二種の植物ホルモン信号伝達制御剤 NJ15 耐性変異体の解析
Analysis about low-sensitive mutants for two phytohormones signal transduction inhibitor NJ15
○塩谷 輝[1]、田中 ナイヤネート[1]、宮崎 翔[1]、細井 昂人[2]、田中 啓介[3]、伊藤 晋作[2]、井内 聖[4]、中野 雄司[5]、小林 正智[4]、中嶋 正敏[1]、浅見 忠男[1] ([1]東大農、[2]東京農大バイオ、[3]東京農大ゲノムセ、[4]理研 BRC、[5]京大生命)
○Hikaru SHIOYA[1], Naiyanate TANAKA[1], Sho MIYAZAKI[1], Akito HOSOI[2], Keisuke TANAKA[3], Shinsaku ITO[2], Satoshi IUCHI[4], Takeshi NAKANO[5], Masatomo KOBAYASHI[4], Masatoshi NAKAJIMA[1], Tadao ASAMI[1] ([1]Univ. of Tokyo, [2]Tokyo Univ. Agri., [3]Tokyo Univ. Agri., [4]RIKEN BRC, [5]Kyoto Univ.)

植物に生じる様々な生理現象の多くは、複数の植物ホルモンの相互作用を介して制御されている。各ホルモンの信号伝達過程は生理作用発現に近づくほど統合や分岐の発生が予想されるため、それに伴って分子レベルでの過程全容解明が容易でない。NJ15 はブラシノステロイド・オーキシン双方の信号伝達を共に制御する化学ツールであり、選抜された NJ15 耐性変異体の一つではクチクラ層に異常が認められた。クチクラ層あるいはそれと隣接する細胞壁に対する化学的制御の結果、シロイヌナズナで選抜した NJ15 耐性変異体の応答を野生型に戻す作用を示す制御剤を見出した。そこで、本発表においてはこれら化学的制御剤を用いて NJ15 耐性変異体の解析をさらに行ったので現状を報告する。

変異体の NJ15 耐性を低下させる制御剤を、変異体および陰性対照の野生型に投与してその影響を調べている。NJ15 に対する耐性度との相関性の観点から、*o*-トルイジンブルーなどを用いた各種染色結果について議論したい。

Phytohormones are synthesized in a plant to regulate its growth and development in response to various environmental changes. Among them, both auxin and brassinosteroid positively function on cell elongation and plant growth. Therefore, several crossing points at their signal transductions have been evoked, but the common signal component(s) required for the so-called crosstalk is little uncovered.

NJ15 inhibits both auxin and brassinosteroid signaling. In our previous research, we had selected a few NJ15-low-sensitive mutants of *Arabidopsis.* We found that one of them is defective in cuticle formation and analyzed the relationship between NJ15 sensitivity and *o*-toluidine blue staining in this mutant. To study the mechanism of its NJ15-low-sensitivity, we treated the chemicals affecting the cell wall to the mutants and evaluated the cuticle's permeability.

auxin, brassinosteroid, cell wall

講演番号：3H04-08
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:30～ ミーティングルーム H

藍抽出液中の植物に対する生理活性物質の探索
Search for bioactive substances toward plants in indigo leaf extract
○平山 遼太[1]、木村 駿太[1]、高橋 郁夫[1]、草島 美幸[1]、佐々木 健郎[2]、浅見 忠男[1] ([1]東大院・農生科・応生化、[2]東北医科薬科大・薬)
○ Ryota HIRAYAMA[1], Shunta KIMURA[1], Ikuo TAKAHASHI[1], Miyuki KUSAJIMA[1], Kenro SASAKI[2], Tadao ASAMI[1] ([1]Univ. of Tokyo, [2]Tohoku Medical and Pharmaceutical Univ.)

アイ（*Polygonum tinctoria*）は古来の染色法である藍染の原料となる植物である。近年，藍染物が抗菌性や防臭性に優れるとして注目を集めている。その抗菌性に期待して，(＋)-リモネンを抽出溶媒としたアイの葉の抽出液（以下，藍抽出液と称する）の製造法が確立された。その農業への応用性を検討するため，農家によって藍抽出液を圃場に散布する試験が行われた。その結果，藍抽出液を散布された農作物は植物病が発生しにくくなるだけでなく，生育が促進されるという現象が観察された。そこで，この現象が藍抽出液に含まれる化合物に起因すると考え，その同定を試みることとした。

最初に，藍抽出液がイネの生育を促進する効果について検討した。藍抽出液の溶媒を減圧下で留去し，その残渣を処理したところ，種子根が伸長した。この試験では種子根が容器の底に接触していたことから，藍抽出液残渣が接触形態形成を抑制している可能性について確認した。その結果，藍抽出液残渣は接触形態形成を誘導するジャスモン酸メチルの作用を阻害した。現在この活性本体の分離、並びにシロイヌナズナにおける応答の確認を試みており，その状況も併せて報告したい。

Indigo (*Polygonum tinctoria*) is known as a raw material of traditional dye called “aizome”. In recent years, the deodorant antibacterial performance of “aizome” products has drawn attention. In anticipation of its antibacterial activity, a method for producing indigo leaf extract using (+)-limonene was established. As part of its application development, farmers reported that the indigo extract induced disease resistance and growth promotion of the treated crops. In this study, we assumed that these phenomena were due to some compounds contained in the indigo extract, and started identification of them.

At first, we examined the effect of the indigo extract on the growth of rice. When the solvent of the indigo extract was distilled off and the residue was applied to rice, seminal roots were elongated. In this test, the seminal roots touched the bottom of the container. Therefore, we confirmed the possibility that the indigo extract residue suppressed thigmomorphogenesis. As a result, the indigo extract residue inhibited the effect of methyl jasmonate, which induces thigmomorphogenesis. At present, isolation of the bioactive substances and the indigo extract application to *Arabidopsis thaliana* are proceeding.

jasmonnic acid, thigmomorphogenesis, seminal root

発表責任者：浅見忠男（asami@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3H04-09
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:30～ ミーティングルーム H

フェアリー化合物の作用機序解明に向けたシロイヌナズナ有用系統の探索

Screening for highly sensitive ecotypes of *Arabidopsis thaliana* against fairy chemicals

○伊藤 綾乃[1]、鈴木 智大[1]、崔 宰熏[2,3]、青木 大地[1]、野村 崇人[1]、岡本 昌憲[1]、河岸 洋和[2,3]([1]宇都宮大・バイオ、[2]静岡大・グリーン研、[3]静岡大・農)

○ Ayano ITO[1], Tomohiro SUZUKI[1], Jae-hoon Choi[2,3], Daichi AOKI[1], Takahito NOMURA[1], Masanori OKAMOTO[1], Hirokazu KAWAGISHI[2,3] ([1]C-Bio, Utsunomiya Univ., [2]Res. Inst. of Green Sci. and Technol., Shizuoka Univ., [3]Dept. of Agr., Grad. Sch. of Integr. Sci. and Technol., Shizuoka Univ.)

芝が円状に繁茂した後に枯死し、最後にキノコが発生するフェアリーリングという現象が知られている。これまでにフェアリーリングを形成する担子菌類コムラサキシメジ (*Lepista sordida*)からフェアリーリング惹起物質として、2-azahypoxanthine (AHX) および ICA (imidazole-4-carboxamide) が単離されている[1-2)]。これら化合物は 5-aminoimidazole-4-carboxamide (AICA)から生合成される。さらに AHX は植物中で代謝産物 2-aza-8-oxohypoxanthine (AOH) に変換された[3)]。これらのフェアリー化合物（FCs）は植物内に内在的に存在し、新しいプリン代謝経路を介して生合成されることが明らかになった[4-5)]。

我々は、この FCs が新規植物ホルモンであると推定し、その受容体探索と作用機序の解明を試みている。そこで本研究では、世界に分布するシロイヌナズナ（*Arabidopsis thaliana*）の 266 系統を用いて、FCs に感受性の高い系統を調査し、受容体探索に有用な系統を探索することを目的とした。現在、全ての系統のスクリーニングを終了し、 AHX、AOH に対して高い感受性を示す複数の系統を見出しており、 EMS 変異集団の作出に向け、再現性および詳細な活性の確認を行っている。

Circular patterns in fields called “fairy rings” represent a phenomenon that occurs mainly on turfgrass due to interaction between basidiomycete fungi and plants. To date, 2-azahypoxanthine (AHX) and imidazole-4-carboxamide (ICA), which regulate plant growth, have been isolated from the basidiomycete *Lepista sordida* [1,2)]. In addition, we have isolated the AHX derivative 2-aza-8-oxohypoxanthine (AOH) from plants [3)]. These three compounds, named fairy chemicals (FCs), are endogenously biosynthesized in plants from 5-aminoimidazole-4-carboxamide (AICA) through a novel purine metabolic pathway [4,5)].

In this study, we screened ecotypes of *Arabidopsis thaliana* highly sensitive to FCs using a total of 266 *A. thaliana* ecotypes to elucidate the signaling pathways and molecular mechanisms of FCs. Finally, completion of the screening indicated that an ecotypes (Vinodolanda) was highly sensitive to AHX and AOH. To obtain ecotypes resistant to these chemicals, ethylmethanesulfonate (EMS)-mutagenesis is in progress.

1) Choi, J.-H. et al. ChemBioChem 11, 1373-1377 (2010).
2) Choi, J.-H. et al. J. Agric. Food Chem. 58, 9956-9959 (2010).
3) Choi, J.-H. et al. Angew. Chemie. Int. Ed. 53, 1552-1555 (2014).
4) Kawagishi, H. Biosci. Biotechnol. Biochem. 82, 752-758 (2018).
5) Kawagishi, H. Proc. Jpn. Acad., Ser. B, 95, 29-38 (2019).

fairy chemicals, *Lepista sordida*, *Arabidopsis thaliana*

発表責任者：鈴木智大（suzukit@cc.utsunomiya-u.ac.jp）

講演番号：3H04-10
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:30～ ミーティングルーム H

標準添加法を用いたミヤコグサにおける植物ホルモン定量法の確立

Validation of standard addition method for quantification of plant hormones in Lotus japonicus

○橋口 拓勇、福島 公貴、橋口 正嗣、田中 秀典、権藤 崇裕、明石 良（宮崎大農）
○Takuyu HASHIGUCHI, Koki FUKUSHIMA, Masatsugu HASHIGUCHI, Hidenori TANAKA, Takahiro GONDO, Ryo AKASHI (Univ. Miyazaki)

[背景および目的] 植物ホルモンは、植物体の発生、成長、ストレス応答に必須のシグナル伝達分子である。植物ホルモンの検出には高速液体クロマトグラフィー連結型質量分析装置(LC-MS)などが用いられているが、マトリクス存在下においてはイオン化に伴い、イオン化抑制といったマトリクス効果が生じる。そのため、安定同位体を用いた分析対象物のピークエリアの補正が行われるが、安定同位体が高価である、入手困難なマイナー代謝物を標的とする際に定量できない、などの問題点がある。そこで我々は、安定同位体を用いない標準添加法による植物ホルモンの定量法を確立することを目的とした。

[方法]ミヤコグサ実験系統 MG20 を分析サンプルとした。播種後 1 か月間栽培した後、葉、茎、根に分けて、TissueLyzer(Qiagen 社)により破砕した。50 mg の組織にアセトニトリルを添加し、Oasis HLB カートリッジ(Waters 社)により固相抽出した。乾固した後、アセトニトリルに再溶解し、植物ホルモン標品混合液に添加することでマトリクス標準液を作成した。サンプルと標準液について、Q-Exactive (Thermo Fisher Scientific 社)による Selected ion monitoring (SIM)により、分離・検出し、Quanbrowser ソフトウェアにより定量した。

[結果および考察]インフュージョン法により植物ホルモン 8 種類のモノアイソトピックイオンの精密質量を測定し、SIM による装置メソッドを作成した。標準品とマトリクス標準液を分析することでマトリクス効果を検討したところ、最大約 90%のイオン化抑制による感度低下が生じることがわかった。ミヤコグサ葉、茎、根について植物ホルモン濃度を安定同位体希釈分析法あるいは標準添加法により分析したところ、両手法間に有意な差は確認されなかった。このことから、標準添加法により、ミヤコグサの植物ホルモンを定量できることが分かった。今後、植物ホルモン合成遺伝子欠損株や根粒形成下における植物ホルモン動態の研究などが期待される。

Plant hormones are important signaling molecules for development, differentiation, growth and stress response in plants. Here, we validated the method to quantify plant hormones by standard addition method. The method requires no stable isotope which is usually expensive and sometimes not commercially available. We quantified plant hormones in *Lotus japonicus*, used as model legume. The present study would facilitate the understandings of roles of plant hormones in *L. japonicus* in mutualistic symbiotic relationships with Rhizobium.

Plant hormone, Lotus japonicus, Quantification

講演番号：3H04-11
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:30～ ミーティングルーム H

ゴビ砂漠緑化、インドの食料増産を実現する植物成長刺激剤「ソムレ」の紹介

“SOMRE” realizes greening of Gobi Desert and increased food production in India

○染井 正徳[1]、染井 秀[1]、粟野 亮二[2]、スネハシ ミシュラ[3]、染井 和子[1] ([1]ソメイヤッコ研究所、[2]グローバル・マーケティング・アソシエーション、[3]ケ―アイ―アイティー大学)
○Masanori SOMEI[1], Hiizu SOMEI[1], Ryoji AWANO[2], Mishra Snehasish[3], Kazuko SOMEI[1] ([1]Somei Yakko Kenkyusho, [2]Global Marketing Association Co., Ltd, [3]KIIT　Univ.)

【序論】我々は植物を成長繁茂させ、地球温暖化改善、食料危機を解決する技術として、根・茎を太く長く伸長させ、種子の発根率を高める簡単な構造を持ち安全な有機化合物の開発を目標として研究を行ってきた。その結果、新規な植物成長刺激剤（ソムレ、SOMRE と命名）の開発に成功した。遺伝子を操作すること無く、ソムレ 1 号は 1.0～0.001 ppm の水溶液として、あるがままの植物の、種子、苗木の根・茎を 1 時間浸漬するだけで効果を発揮する。これ迄に、野菜や花卉類、漢方生薬、絶滅危惧植物等に応用してきている。今回、地球温暖化・気候変動を防ぐ目的で実施した、中国内モンゴル、ゴビ砂漠の緑化、食料危機を救う為、インドで「米」の増産を試みた結果について詳細を報告する。
【実験と結果】ゴビ砂漠自生の植物（花棒、サーガイゾー）の種子又は苗木の根を、ソムレ 1 号 1.0 ppm 水溶液に浸漬すると、根長は通常の約２～３倍にも伸長した。この効果により、根は砂漠深部の水分の含まれる砂層まで届き、その後は自ら水を求めて伸長するので、年間降雨量僅か 150 mm の砂漠でも、雨のみを水資源として活着して、一部緑化に成功した。インドの農民は「米」種子を同様にソムレ処理して水田に撒き、収穫した。通常インド「米」の収穫は 5,100 Kg/ha であり、日本の通常「米」の収穫量、6,000 Kg/ha より下回る。しかしインド農民が「米」種子を 1.0 又は 0.1 ppm のソムレ水溶液に 1 時間浸漬するという操作を加えただけで、収穫量は、それぞれ 6,510 Kg, 6,833 Kg/ha と向上した。日本の優れた農業技術を必要とせずに、ただソムレ液に浸漬するだけで、それぞれ通常より 127、134％の増収を達成した。他の野菜でも増収し、インドの食料事情を改善する可能性を見出した。**【結論】**ソムレ 1 号は植物全般の成育を促進し、SDGs, No.2, No.15 を目標とする食料増産、砂漠緑化・気候変動抑止に貢献できる。成長メカニズムは未検討である。興味を持たれた研究者の協力を得たい。We developed a new plant growth stimulant (named SOMRE). SOMRE is used as an aqueous 1.0 to 0.001 ppm solution. By immersing the seeds or roots / stems for 1 h, plant roots become longer and fatter than the control. It was efficient to make the Gobi Desert in Inner Mongolia, China, to green partly only with rain. While in India, the SOMRE was successful to increase the production of ″rice″ to save the food crisis. We report the details of both results. The growth mechanism of the rhizome has not been investigated. [Conclusion] SOMRE would contribute to SDGs, No.2 and No.15. M. Somei, Heterocycles, 2011, **82**, 1007. S. Mishra, M. Somei, R. Awano, et al, Plant Physiology Reports, 2020, **25**, 284.

Greening of gobi desert, Increasing food production, Improving climate change

発表責任者：染井正徳（someiyakko@smail.plala.or.jp）

講演番号：3H04-12
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:30～ ミーティングルーム H

塩ストレス下のイネにおけるオーキシン代謝物の分析

Analysis of auxin metabolites in rice plants under salt stress

○礒邊 拓也、宮川 恒（京大農）
○Takuya ISOBE, Hisashi MIYAGAWA (Kyoto Univ.)

【目的】植物ホルモンのオーキシンは成長制御に関わるが, ストレス応答に関する機能はほとんど明らかになっていない。オーキシン濃度はさまざまな恒常性維持メカニズムにより制御されているため, ストレス応答時の濃度変化を十分に追跡できず, その重要性が見逃されてきた可能性がある。そこで本研究では, 塩ストレス処理を行ったイネについてインドール-3-酢酸 （IAA） およびその代謝物を定量し, ストレス応答時の IAA 合成量を評価した。
【方法】発芽後 5 日間水耕栽培したイネ（cv 日本晴）を 200 mM NaCl 水溶液で 24 時間生育し, 地上部と根部に分けて 80%アセトン水溶液で抽出した。抽出液と培養液をそれぞれ濃縮し, 固相抽出により精製した後, LC-ESI-MS/MS（Shimadzu LCMS-8030）分析に供した。
【結果・考察】地上部および根部における IAA の濃度は塩処理によりほとんど変化しなかったのに対し, 地上部において IAA-Glu 濃度の上昇, 根部において DiOxIAA-Asp 濃度の低下が見られた。一方、培養液中には IAA、OxIAA, DiOxIAA, DiOxIAA-Glu, DiOxIAA-Asp の顕著な増加が見られた。培養液中の代謝物組成は根部と異なっていたことから, 塩ストレス処理によりなんらかの能動的な排出が起こったものと考えられた。地上部, 根部および培養液中の IAA および IAA 代謝物の総和を計算すると処理による大きな増加が認められ, 塩ストレス応答時に IAA 合成が活性化されることが明らかになった。

The plant hormone auxin is involved in growth control, but its function in stress response remains unknown. Since the concentration of auxin is maintained by multiple homeostatic mechanisms, it is likely that the change in auxin levels in response to the stress has failed to be traced. In this study, to evaluate the auxin biosynthetic activity under the stressed conditions, indole-3-acetic acid (IAA) and its metabolites in the rice plant were quantitatively analyzed.

Rice plant seedlings (cv Nipponbare) grown hydroponically for 5 days after germination were treated with 200 mM NaCl for 24 hours, and the shoots and roots were separated to be extracted in 80% acetone. The extracts and the culture fluid were concentrated and purified by solid-phase extraction and analyzed by LC-ESI-MS/MS (Shimadzu LCMS-8030).

The levels of IAA were unchanged both in shoots and roots, whereas the levels of IAA-Glu in the shoots and DiOxIAA-Asp in the roots were increased and decreased, respectively. In addition, relatively high levels of IAA, OxIAA, DiOxIAA, DiOxIAA-Glu, and DiOxIAA-Asp were detected in the culture fluid. The total amount of IAA and the metabolites in the shoots, roots, and culture fluid was significantly increased by the treatment, suggesting the elevation of IAA biosynthetic activity in rice plant seedlings in response to the salt stress.

Indole-3-acetic acid, Oryza sativa, LC-MS/MS

発表責任者：礒邊　拓也（isobe.takuya.88n@st.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3H04-13
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:30～ ミーティングルーム H

強光下のアスコルビン酸高蓄積への再生系の関与
Involvement of ascorbate recycling system in high accumulation of ascorbate under high light
濱田 あかね[1]、寺井 佑介[1]、小川 貴央[1]、宮城 敦子[2]、川合 真紀[2]、石川 孝博[1]、○丸田 隆典[1] ([1]島根大・生資科・生命工、[2]埼玉大・理工)
Akane HAMADA[1], YUSUKE TERAI[1], Takahisa OGAWA[1], Atsuko MIYAGI[2], Maki KAWAI-YAMADA[2], Takahiro ISHIKAWA[1], ○Takanori MARUTA[1] ([1]Fac. Life Environ. Sci., Shimane Univ., [2]Grad. Sch. Sci. Eng., Saitama Univ.)

植物はアスコルビン酸を極めて高濃度に蓄積し、細胞内のレドックスバッファーとして利用する。アスコルビン酸は一電子酸化によりモノデヒドロアスコルビン酸（MDHA）となり、続く不均化反応により二電子酸化型のデヒドロアスコルビン酸（DHA）が生じる。これらの酸化型は不安定であり、速やかに不可逆的な分解を受けるため、高濃度の還元型アスコルビン酸を維持するためには酸化型からの再成系が重要である。DHA 還元酵素（DHAR）は還元型グルタチオン（GSH）依存的な DHA 還元反応を触媒する。シロイヌナズナには 3 つのアイソフォームが存在し、細胞質(DHAR1 および 2)と葉緑体(DHAR3)に局在する。これらの生理学的重要性を調べるために、全アイソフォームの三重欠損株（Δ*dhar*）を作出した。Δ*dhar* では強光ストレス下でのアスコルビン酸蓄積が若干抑制された。しかし、野生株との差はわずかであり、Δ*dhar* は野生株レベルの強光耐性能を保持した。GSH は非酵素的な反応によって DHA を還元しうることから、GSH が DHAR を相補している可能性が考えられた。そこで、GSH 欠乏変異株（*pad2*）とΔ*dhar* を掛け合わせた四重変異株を作出した。その結果、弱光条件ではΔ*dhar pad2* のアスコルビン酸レベルは野生株と同程度であったが、強光条件でのアスコルビン酸の高蓄積は四重変異株でほぼ完全に抑制された。同時に、アスコルビン酸の分解産物である L-トレオン酸の蓄積も見られた。これらのことから、GSH 依存的な酵素反応（DHAR）および非酵素反応の協働が強光条件でのアスコルビン酸高蓄積に不可欠であることが明らかになった。現在、もう一つの GSH 欠乏変異株アリル（*cad2*）を用いて上記の結果を再検証するとともに、*dhar1 dhar2 cad2* および *dhar3 cad2* を作出し、GSH と DHAR の協働に重要な細胞内コンパートメントの特定を試みている。

To accumulate ascorbate at very high levels, recycling it from oxidized form is important. Dehydroascorbate reductases (DHARs) are enzymes that catalyze the reduction of dehydroascorbate (DHA) to ascorbate and use reduced form of glutathione (GSH) as an electron donor. To study the role of DHARs, we generated an Arabidopsis triple mutant (Δ*dhar*) lacking all three DHARs. However, the impact of the triple knockout on ascorbate pool size under high light was slight. Since GSH itself is known to reduce DHA to ascorbate in a non-enzymatic manner, this reaction might compensate for the enzymatic DHAR reaction. This hypothesis was clearly supported by our genetic study using a quadruple mutant that lacks all DHARs and functional GSH biosynthesis.

ascorbate, dehydroascorbate, glutathione

発表責任者：丸田隆典（maruta@life.shimane-u.ac.jp）

講演番号：3H04-14
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:30～ ミーティングルーム H

高温雄性不稔に関連する Myb 様イネ転写因子のタンパク質機能解析

Analysis of Myb-like transcription factor relating to high-temperature-induced male sterility

○戸澤 譲[1]、黒田 隆司[1]、東谷 篤志[2]、川岸 万紀子[3] ([1]埼玉大院理工、[2]東北大院生命科学、[3]農研機構)
○ Yuzuru TOZAWA[1], Ryuji KURODA[1], Atsushi HIGASHITANI[2], Makiko KAWAGISHI-KOBAYASHI[3] ([1]Saitama Univ., [2]Tohoku Univ., [3]NARO)

イネの花粉形成は高温条件に高い感受性を示す．我々はこれまでに，高温条件において複数の遺伝子が未成熟花粉での発現量低下を示すことを確認している．遺伝学的解析の結果は，シロイヌナズナ Myb80 のオーソログ OsMyb80 がこれらの高温条件で低下する特定遺伝子群の発現を制御することを強く示唆している．本研究では，OsMyb80 タンパク質が候補遺伝子の発現制御領域の DNA 断片への結合能を有するか否かを electrophoresis mobility shift assay (EMSA)により検証した．組換え大腸菌による完全長タンパク質の調製は困難なため，C 末端側を欠損させた推定 DNA 結合領域を含むタンパク質 OsMyb80_ΔCTD を調製して DNA 結合試験を行った．その結果，高温条件特異的に発現が抑制される遺伝子 *CYP703A3* の上流領域を含む DNA 断片に OsMyb80_ΔCTD が特異的に結合することを確認した．さらにコムギ胚芽抽出液（セルフリーサイエンス社）を用いて N 末端に His_6 タグ付加した完全長タンパク質 OsMyb80_NH の調製を試みたところ，可溶性の精製 OsMyb80_NH を得ることに成功した．EMSA の結果，CYP703A3 の上流領域配列への OsMyb80_NH の結合を確認できた．本講演では，上記の研究結果とともに，他の候補遺伝子の解析結果についても紹介したい．

Pollen development in rice is susceptible to high temperature (HT). We confirmed that a series of genes are down-regulated in the premature anthers under the HT condition. Based on the genetical approaches, we identified OsMYB80, a rice orthologue of Arabidopsis MYB80, as a transcription factor that regulates these HT-repressed genes (HTRGs). To gain evidence that proves the function of OsMyb80 as a transcription factor in the regulation, we examined the binding ability of recombinant OsMyb80 protein to DNA fragments that include the upstream region of the HT-repressed genes. Expression of OsMyb80 in the *E. coli* system failed to prepare the full-length (FL) protein. We therefore constructed OsMyb80_ΔCTD, in which the C-terminal region is truncated. Based on electrophoresis mobility shift assay (EMSA), we confirmed that the OsMyb80_ΔCTD binds to the upstream region of *CYP703A3*, a major HTRG. We next attempted to synthesize a FL OsMyb80 having N-terminal His_6-tag (OsMyb80_NH) by wheat-germ cell-free expression system (cell-free science). We could obtain purified OsMyb80_NH as a soluble form. OsMyb80_NH exhibited specific binding to the DNA fragment of the upstream region of *CYP703A3*. Results from EMSA for other HTRGs will be presented in this session.

rice, transcription factor, male sterility

発表責任者：戸澤譲（tozawa@mail.saitama-u.ac.jp）

講演番号：3H04-15
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:30～ ミーティングルーム H

ダイズ耐塩性関連遺伝子 *GmTDF-5* のプロモーター解析

Promoter analysis of the *GmTDF-5* gene, a soybean salt-responsive gene encoding a protein of unknown function

○黒澤 まりな、牧野 果子、高木 ひかり、須藤 弘樹、野口 和斗、小島 俊雄（茨城大農）
○Marina KUROSAWA, Kako MAKINO, Hikari TAKAGI, Koki SUTO, Kazuto NOGUCHI, Toshio KOJIMA (Ibaraki Univ.)

ダイズ遺伝子 *GmTDF-5*（*Glycine max* Transcript-Derived Fragment-5）は、タンパク質間相互作用に関わるアルマジロリピート構造とロイシンジッパーを有する機能未知タンパク質をコードしており、その過剰発現はシロイヌナズナの耐塩性を上昇させる。*GmTDF-5* 遺伝子の発現は塩ストレス処理したダイズの葉や茎で強く誘導されることから、地上部器官の塩ストレス応答・耐性機構に関与していると推測される。本研究では、*GmTDF-5* が制御する耐塩性機構の特定に向け、プロモーター解析により同遺伝子の組織特異的発現性を詳細に特徴付けることにした。

シロイヌナズナを宿主に作成された、*GmTDF-5* プロモーター4.8 kb 領域で制御した GUS 発現系統を 200 mM NaCl で処理したところ、処理時間の経過とともに GUS 発現組織が下葉から上葉へと広がっており、特に維管束組織で強い発現が観察された。原子吸光分析により組織に蓄積したナトリウムを定量した結果、葉における GUS 発現はナトリウム蓄積量に依存することが明らかになったが、ナトリウムが最も蓄積していた根で GUS 発現は観察されなかった。*GmTDF-5* プロモーター制御の GUS 発現は、200 mM KCl に対しても NaCl 同様強い誘導が見られたが、浸透圧ストレス（200 mM mannitol+200 mM sorbitol）では NaCl や KCl ほどの発現は見られなかった。以上の結果は、*GmTDF-5* が塩ストレスを構成する要素のうち、主にイオンストレスに対して地上部器官、特に維管束周辺で応答していることが明らかとなった。現在、LUC アッセイにより *GmTDF-5* プロモーター上、塩ストレス応答性を特徴付ける制御領域の特定を進めており、これらの結果を合わせて *GmTDF-5* が制御する塩ストレス応答・耐性機構について考察したい。

GmTDF-5 is a soybean salt-responsive gene that encodes a protein of unknown function. Overexpression of *GmTDF-5* increases salt tolerance in transgenic *Arabidopsis*. In this study, we characterized tissue-specific transcriptional regulation of *GmTDF-5* using the reporter gene assays. In transgenic *Arabidopsis* harboring the *GmTDF-5* promoter-GUS chimeric gene, GUS activity was differentially induced in the leaves under 200 mM NaCl, expanding from lower leaves to upper leaves during the salt stress, and observed predominantly around vascular bundles. The GUS activity in the leaves relied on Na concentration accumulated in the tissues; however, the activity in roots was not observed. These results suggest that *GmTDF-5* regulates the salt response and tolerance in the aerial part of the plant.

salt tolerance, tissue-specific transcription, ionic stress

講演番号：3H04-16
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:30～ ミーティングルーム H

カタラーゼ欠損株における酸化ストレス誘導性細胞死のレドックス調節

Redox regulation of oxidative stress-induced cell death in catalase deficient plants

○菊樂 香奈[1]、三冨 弦[1]、松浦 恭和[2]、森 泉[2]、小川 貴央[1]、石川 孝博[1]、丸田 隆典[1]([1]島根大院・自然科学、[2]岡山大・植物研)
○ Kana KIKURAKU[1], Gen Mitomi[1], Takakazu Matsuura[2], Izumi Mori[2], Takahisa Ogawa[1], Takahiro Ishikawa[1], Takanori Maruta[1] ([1]Grad. Sch. Nat. Sci. Technol., Shimane Univ., [2]Inst. of Plant Sci. and Resour., Okayama Univ.)

植物において主要な H_2O_2 生成部位はペルオキシソームと葉緑体であり、各オルガネラでカタラーゼ（CAT）とアスコルビン酸ペルオキシダーゼ（APX；ストロマ型 sAPX およびチラコイド膜結合型 tAPX）が主要 H_2O_2 消去酵素として機能する。これらの反応を免れた H_2O_2 は、細胞質型 APX1 によって消去される。中程度の光強度下の主要カタラーゼ欠損株（*cat2*）では、酸化型グルタチオン（GSSG）およびサリチル酸（SA）の蓄積に起因して著しい細胞死が生じる。興味深いことに、細胞質型 APX1 の欠損は *cat2* の細胞死を緩和することが知られている。本研究では、*cat2* における細胞死の調節機構をさらに調べるため、これらの H_2O_2 消去酵素の多重欠損株を用いて解析した。弱光から強光（HL）へのシフトにより、*cat2* は明確な細胞死を示したが、これは細胞質型 APX1 の欠損により回復した。また、HL 下の *cat2* ではアスコルビン酸の低下と GSSG の蓄積が生じたが、どちらも *apx1 cat2* で軽減された。一方、葉緑体型 APX の欠損は *cat2* の細胞死やレドックス状態に影響しなかった。興味深いことに、*apx1 sapx tapx cat2* 四重欠損株では、アスコルビン酸の低下と GSSG の蓄積が低減されたにも関わらず、もっとも強烈な細胞死を示した。さらなる解析により、HL 下の *cat2* における細胞死には SA が関与しないことが示された。現在、これらの多重欠損株の RNA-seq 解析を進めている。

An *Arabidopsis cat2* mutant lacking a major catalase isoform shows photo-bleaching phenotype under moderate light conditions. This cell death is known to be triggered by accumulation of oxidized glutathione (GSSG) and salicylic acid (SA). Interestingly, it was reported that the *cat2* cell death is alleviated by the lack of cytosolic APX1 through unknown mechanisms. To study the cell death mechanism in more depth, we herein generated *apx1 cat2* as well as *sapx tapx cat2*, in the latter of which chloroplast APX isoforms (sAPX and tAPX) were knocked out together with CAT2. Upon shift from low to high light (HL), *cat2* showed a severe cell death phenotype with enhanced GSSG accumulation. The cell death and GSSG accumulation were alleviated by the lack of APX1, but not of sAPX and tAPX, suggesting that only cytosolic APX1 facilitates glutathione oxidation to trigger the cell death in *cat2*. However, the alleviation of cell death by the APX1 knockout was cancelled by additional lack of chloroplast APXs (i.e., quadruple mutant). Further genetic and hormonomic analyses revealed that SA is not involved in the *cat2* cell death. Now we are carrying out RNA-seq analysis using the multiple mutants.

oxidative stress, catalase, ascorbate peroxidase

講演番号：3H04-17
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:30～ ミーティングルーム H

圧力変化に対する DPPC 二分子膜流動性へ及ぼす不飽和脂肪酸の影響

Effects of unsaturated fatty acid on the biomembrane fluidity in pressure change

○上野 弘人、沼 優、楠部 真崇、西本 真琴 (和歌山高専)
○Hiroto Ueno, Yu Numa, Masataka Kusube, Makoto Nishimoto (NITWC)

生物は生命を維持するため、生息する環境条件に合わせた組成の生体膜を持ち、膜流動性を保っている。本研究では、人工モデル膜である 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DPPC)二分子膜を用い、圧力変化に対する膜流動性に及ぼす一価不飽和脂肪酸の影響を時間分解蛍光異方性測定により調査した。50 ºC における DPPC 純粋系では、約 37 MPa において異方性値に急激な上昇が見られた。これは、DPPC 二分子膜の流動性の高い液晶相から流動性の低いゲル相への主転移圧力と一致する。DPPC 二分子膜へ一価不飽和脂肪酸を持つ 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DOPC)を添加すると、DOPC 濃度が増加するにつれて主転移圧力は高圧側にシフトし、ゲル相よりも液晶相が安定化することが示された。得られた異方性値の結果からオーダーパラメーター*S* 及び回転拡散係数 D_w を算出した。前者は脂質分子間隔, 後者は脂質分子運動に関連づけれられる。DOPC 存在下では、DPPC 純粋系に比べて *S* 値は減少し、D_w 値は増加したことから、脂質分子の間隔が広がったと同時に、脂質分子の運動性が増加したことが分かった。これは、DOPC の折れ曲がった構造に起因していると考えられる。またこの結果は、DPPC 二分子膜流動性へ及ぼす多価不飽和脂肪酸である *cis*-4,7,10,13,16,19-docosahexaenoic acid (DHA)の結果と同様の傾向であることが明らかとなった。

Organisms maintain membrane fluidity by changing their biomembrane composition to match the environmental conditions in which they live. In this study, the effect of monounsaturated fatty acid to 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DPPC) bilayer membrane fluidity under high pressure was investigated by time-resolved fluorescence anisotropy measurement. At 50 ºC, anisotropy value of the DPPC pure system was observed abrupt increase at 37 MPa. This pressure accords with the main transition pressure from the liquid crystal phase to the gel phase of DPPC bilayer membrane. Addition of DOPC to DPPC bilayer membrane showed that the main transition pressure shifts toward high pressure and the liquid crystalline phase is stabilize. Calculated order parameter and rotational diffusion coefficient from obtained anisotropy value decreased and increased, respectively. These results suggest that the spacing between the lipid molecules and mobility was increased. These are considered that caused by the folded structure of the DOPC. Moreover, this result shows that similar to the influence of cis-4,7,10,13,16,19-docosahexaenoic acid (DHA), a polyunsaturated fatty acid, to DPPC bimolecular membrane fluidity.

biomembrane, pressure change, unsaturated fatty acid

講演番号：3H07-01
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:30～ ミーティングルーム H

二環性シアル酸供与体を活用したジシアリル抗原糖鎖の簡便合成

Facile synthesis of the disialyl-T antigen derivative via α-selective sialylation as a key reaction

○豊島 智三[1]、今村 彰宏[1]、石田 秀治[1,2,3]([1]岐阜大・応用生物、[2]岐阜大・G-CHAIN、[3]東海国大機構・iGCORE)
○Tomozo Toyoshima[1], Akihiro Imamura[1], Hideharu Ishida[1,2,3] ([1]Gifu Univ., [2]G-CHAIN, Gifu Univ., [3]iGCORE)

【背景・目的】がん（悪性新生物）は日本人の死亡原因の第一位である。がんの治療において重要なことは早期発見であり、そのためには罹患を正確に判定できる診断方法の開発が求められる。これまでに様々な診断法が開発されてきたが、我々はがん化によって変化する「糖鎖」を利用した診断法の開発を目指している。細胞ががん化すると細胞表面上の糖鎖構造が変化するため、糖鎖は腫瘍マーカーとして利用できる。本研究では、膵臓がんにおいて高発現するジシアリル T 抗原糖鎖に着目した[1]。ジシアリル T 抗原は、Galβ(1,3)GalN 二糖骨格の Gal3 位、GalN6 位に α 結合を介してシアル酸が二残基結合した四糖構造からなる。本研究では、近年当研究室で開発した α-シアリル化法を活用し、ジシアリル T 抗原糖鎖の簡便な合成を目指すこととした。
【方法・結果】本研究では、目的とする四糖構造を Galβ(1,3)GalN 二糖とシアル酸に分割し、Galβ(1,3)GalN 二糖受容体に対して、二残基のシアル酸を同時にグリコシル化反応により導入することで簡便に四糖構造を構築する合成戦略を立案した。この戦略で鍵となるのが、二糖受容体にシアル酸を導入する α-シアリル化反応である。当研究室では、近年「二環性シアル酸供与体[2]」を用いた完全立体選択的な α-シアロシド構築法を開発した。本研究ではこれを活用することにより、容易に四糖骨格の構築が可能になると考えた。まず、Gal および GalN・HCl の各単糖から Galβ(1,3)GalN 二糖受容体を合成した。当該受容体は、Gal 残基の 3,4 位および GalN 残基の 4,6 位に遊離の水酸基をもつテトラオール体である。得られた二糖受容体に対し、二環性シアル酸供与体を用いた α-シアリル化反応を試みた。その結果、狙い通り完全な α 選択性で、かつ位置選択的にシアリル化が進行し、極めて簡便に四糖骨格の構築に成功した。従来のシアリル化法では、シアル酸を二箇所同時に導入すると立体異性体の分離が煩雑になり目的物の単離が困難となるが、二環性シアル酸供与体を用いることで、従来の課題を克服することが可能になった。最後にすべての保護基を除去することで、目的のジシアリル T 抗原糖鎖の合成を達成した。

We have achieved a facile chemical synthesis of the disialyl-T antigen derivative expressed on some cancer cells. The key feature of the present synthesis is the α-selective sialidation with the bicyclic sialyl donor [2]. Double sialylation of Galβ(1,3)GalN disaccharide acceptor afforded the desired disialyl-T tetrasaccharide framework in good yield and subsequent global deprotection delivered the target disialyl-T derivative.

[1] Swanson, B. J. *et al. Cancer Res.* **2007**, *67*, 10222–10229. [2] Komura, N. *et al*. *Science* **2019**, *20*, 677–680.

α-sialylation, disialyl-T antigen, oligosaccharide

発表責任者：今村彰宏（aimamura@gifu-u.ac.jp）

講演番号：3H07-02
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:30～ ミーティングルーム H

二環性シアル酸を用いたα(2,9)ポリシアル酸の合成研究

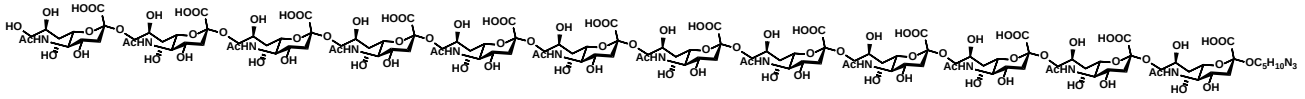
Study on the synthesis of α(2,9)-polysialic acid by using bicyclic sialic acids

○加藤 雅大[1]、白崎 淳哉[2,3]、河村 奈緒子[2,3]、田中 秀則[2,3]、今村 彰宏[1]、石田 秀治[1,2,3]、安藤 弘宗[2,3]（[1]岐阜大・応用生物、[2]岐阜大・G-CHAIN、[3]東海国大機構・iGCORE）
○Masahiro KATO[1], Junya SHIRASAKI[2,3], Naoko KOMURA[2,3], Hidenori TANAKA[2,3], Akihiro IMAMURA[1], Hideharu ISHIDA[1,2,3], Hiromune ANDO[2,3] ([1]Dept. of Applied Bioorganic Chemistry, Gifu Univ., [2]G-CHAIN, Gifu Univ., [3]iGCORE, THERS)

【目的】α(2,9)ポリシアル酸を有する糖タンパク質は髄膜炎の原因菌の莢膜に発現し、感染との深い関連性が注目されている。しかしながら、構造均一なポリシアル酸を天然から取得することは困難であるため、ポリシアル酸のかかわる感染機序の解明は進んでない。本研究は、その問題をポリシアル酸の化学合成によって解決することを目的としている。

【方法・結果】ポリシアル酸の化学合成の課題は、シアル酸のグリコシド化（シアリル化）の立体制御と鎖長伸長に伴う合成中間体の難溶化である。この問題に対して、完全なα選択的シアリル化法である二環性シアル酸[1]と有機溶媒への溶解性を高めることができる保護基[2]を組み合わせる戦略を立案し、α(2,9)ポリシアル酸の合成を検討した。先行実験より全ての水酸基が無保護の二環性シアル酸受容体を用いても 9 位選択的シアリル化が可能であることを見出した。これを受け、受容体および供与体の設計を行った。さらに、脱離基としてフェニルスルフェニル基とホスフェート基というオルソゴナルな組み合わせを採用し、供与体および受容体への変換を簡略化することにより、効率的な多量化を目指した。その結果、同モル等量の単糖供与体と単糖受容体を用いたシアリル化反応により収率 94%でシアル酸二糖骨格を得ることができた。更に、この二糖を供与体および受容体へと導き、再び同モル等量でのグリコシド化を行うことで、収率 80%でシアル酸四糖骨格を得ることに成功した。現在、同戦略によるさらなる鎖長伸長を検討しており、その結果も併せて報告する。

The purpose of this study is to synthesize α(2,9) polysialic acid in chemical manner. We employed a convergent synthetic strategy utilizing, bicyclic sialic acid donor and acceptor to achieve stereoselective and efficient glycosylation between sialic acids. As a result, [1+1] sialylation of equimolar donor and acceptor has afforded a dimer in 94% yield. Similarly, [2+2] sialylation has afforded a tetramer in 80% yield. We are attempting the elongation of the sequence by doubling the length of oligosialic acid donor and acceptor.



The longest chemically synthesized α(2,9) polysialic acid [3]

[1] N. Komura *et al. Science* **2019**, *364*, 677-680.;
[2] S. Asano *et al. Org. Lett.* **2019**, *21*, 4197-4200.;
[3] K.-C. Chu *et al*. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 9391-9395.

polysialic acid, α-sialylation, block synthesis

講演番号：3H07-03
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:30～ ミーティングルーム H

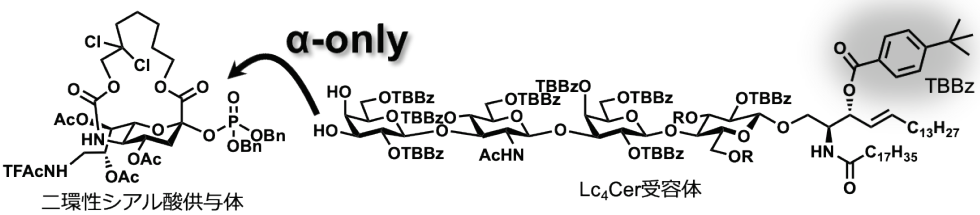
脂質ラフトの 1 分子イメージングに向けたラクト系ガングリオシドプローブの合成

Synthesis of lacto-series ganglioside probes for single-molecule imaging of lipid rafts

○高橋 舞菜[1]、白崎 淳哉[2,3]、河村 奈緒子[2,3]、田中 秀則[2,3]、今村 彰宏[1]、石田 秀治[1,2,3]、安藤 弘宗[2,3] ([1]岐阜大・応用生物、[2]岐阜大・G-CHAIN、[3]東海国大機構・iGCORE)
○Maina TAKAHASHI[1], Junya SHIRASAKI[2,3], Naoko KOMURA[2,3], Hidenori TANAKA[2,3], Akihiro IMAMURA[1], Hideharu ISHIDA[1,2,3], Hiromune ANDO[2,3] ([1]Dept. of Applied Bioorganic Chemistry, Gifu Univ., [2]G-CHAIN, Gifu Univ., [3]iGCORE, THERS)

（目的）細胞膜ドメインである脂質ラフトの形成機構や機能の詳細解明には、主要な構成分子であるガングリオシドの動態解明が必要である。我々はこれまでに、母核糖鎖構造の異なるガングリオ系およびグロボ系ガングリオシドの蛍光プローブの合成を行い、その 1 分子イメージングにより糖鎖構造の違いがラフト関連分子との相互作用に影響を与えることを明らかにした[1]。本研究は、脂質ラフトでの動態が不明なラクト系ガングリオシドを標的とし、蛍光プローブの合成と 1 分子イメージングによる動態解明を目的としている。標的化合物である蛍光シアリルラクトテトラオシルセラミド(NeuAcLc$_4$Cer)の合成においては、合成の効率化を狙い、シアル酸グリコシド化（シアリル化）の完全な立体制御法[2]を応用した新たなアプローチを試みた。

（方法・結果）ガングリオシドの新たな合成アプローチとして、合成終盤で糖脂質受容体に対し直接シアル酸を導入する手法を考案した。そこで、9 位水酸基を TFAc アミド基で置換した二環性シアル酸供与体と四糖を含む Lc$_4$Cer 受容体のグリコシド化を計画した。Lc$_4$Cer 受容体は、低温下での溶解性を高めるため、近年当研究室で開発した TBBz 基[4]を水酸基の保護基として用いた設計とした。まずは、モデル実験として二糖の LacCer 受容体のシアリル化を試み、ガングリオシド GM3 が合成可能であることを確認した[3]。次に、蛍光 NeuAcLc$_4$Cer 合成に向け、Lc$_4$Cer 受容体の合成を行った。まずは、GlcN 供与体と Gal 受容体から二糖を構築し、非還元末端側 Gal 供与体とグリコシド化することで三糖骨格を得た。その後、GlcCer の導入により、Lc$_4$Cer 骨格を構築した。得られた Lc$_4$Cer を受容体へと変換し、二環性シアル酸供与体とのシアリル化を検討した。以上の結果について詳細を報告する。



This study aims to develop fluorescent probes of lacto-series gangliosides for study of lipid rafts by single-molecule imaging. For the efficient synthesis of the fluorescent ganglioside probes, we examined a late-stage sialylation of glycolipid acceptors by using a macro-bicyclic sialyl donor[1,3].

[1] N. Komura *et al., Nat. Chem. Biol.* **2016**, *12*, 402. [2] N. Komura *et al., Science* **2019**, *364*, 677.
[3] M. Takahashi *et al., Org. Biomol. Chem.* **2020**, *18*, 2902. [4] S. Asano *et al., Org. Lett.* **2019**, *21*, 4197.

lacto-series ganglioside, lipid raft, sialic acid

講演番号：3H07-04
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:30～ ミーティングルーム H

完全にα選択的な Kdo グリコシド化法の開発研究

Study on a method for full α-selectivity in Kdo glycosidation

○浜島 将伍[1,2]、野口 晴佳[3]、河村 奈緒子[4,5]、田中 秀則[2,4,5]、今村 彰宏[1,2]、石田 秀治[1,2,4,5]、一柳 剛[3]、安藤 弘宗[2,4,5]（[1]岐阜大・応用生物、[2]岐阜大・連合農学、[3]鳥取大・農、[4]岐阜大・G-CHAIN、[5]東海国大機構・iGCORE）

○ Shogo HAMAJIMA[1,2], Haruka NOGUCHI[3], Naoko KOMURA[4,5], Hide-Nori TANAKA[2,4,5], Akihiro IMAMURA[1,2], Hideharu ISHIDA[1,2,4,5], Tsuyoshi ICHIYANAGI[3], Hiromune ANDO[2,4,5] ([1]Dept. Appl. Bioorg. Chem., Gifu Univ., [2]United Grad. Sch. Agr. Sci., Gifu Univ., [3]Fac. Agr., Tottori Univ., [4]G-CHAIN, Gifu Univ., [5]iGCORE, THERS)

【目的】3-Deoxy-D-*manno*-oct-2-ulosonic acid (Kdo) は、グラム陰性菌、植物、藻類などの哺乳類以外の生物が有するケトアルドン酸の一種である。この糖は、グラム陰性菌が有するリポ多糖の内部コア領域に存在し、この領域の糖鎖がもつ免疫学的な作用の観点などから近年注目されている。これらのKdo含有糖鎖の生理学的な機能の解明には、化学的合成による研究試料の安定的供給が肝要である。

天然に存在するKdoグリコシドはそのほとんどがα-グリコシドであるため、これまでに様々なα選択的Kdoグリコシド化法の開発が行われてきた。しかし、従来法には基質や反応条件により立体選択性にばらつきがあるという共通の課題が残されている。そこで本研究では、完全なα選択的Kdoグリコシド化法の開発を目的とした。

【方法・結果】Kdo とシアル酸の構造的な類似点から、本研究では当研究室で近年確立した完全なα選択的シアロシド化法である「二環性シアル酸供与体」を用いる方法[1]を Kdo に応用した「二環性 Kdo 供与体」の構造が縮合反応に与える影響を検証することとした。まず初めに、大員環の員数が目的物の収率に大きく影響することが想定されたため、大員環部分として 14-18 員環を有する二環性 Kdo 供与体を合成し、グルコース一級水酸基とのグリコシド化の比較検討を行った。その結果、いずれの員数の二環性 Kdo 供与体を用いた反応においても、得られたグリコシドは目的とするα-グリコシドのみであった。この検討では、17 員環を有する Kdo 供与体が最も高い収率でグリコシドを与え、その収率は 84%であった。次に、グルコース一級水酸基とのグリコシド化において最も良い収率で目的物を与えた 17 員環二環性 Kdo 供与体を用い、4 種の糖受容体とそれぞれグリコシド化反応に供し、基質適用範囲の検証を行った。また、様々な脱離基を有する 17 員環二環性 Kdo 供与体を合成し、グルコース一級水酸基とのグリコシド化の比較検討を行うことで、脱離基がグリコシド化反応に与える影響の検証も行った。これらの検証の結果も併せて報告する。

[1] Komura, N. *et al. Science* **2019**, *364*, 677-680.

3-Deoxy-D-*manno*-oct-2-ulosonic acid (Kdo), a ketoaldonic acid, mainly constitutes the inner core region of bacterial lipopolysaccharides. Since Kdo glycosides dominantly exist in nature as the α-anomer, various methods for α-selective glycosidation of Kdo have been developed. However, the stereoselectivity of the Kdo glycosidation methods varies depending on the substrates and reaction conditions. Herein, we report a method for fully α-selective Kdo glycosidation by utilizing a bicyclic ring system.

Kdo, α-glycosidation, bridgehead cation

講演番号：3H07-05
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:30～ ミーティングルーム H

2 位 *N*-イミドイル保護グルコース供与体を用いた高 β 選択的グリコシル化反応

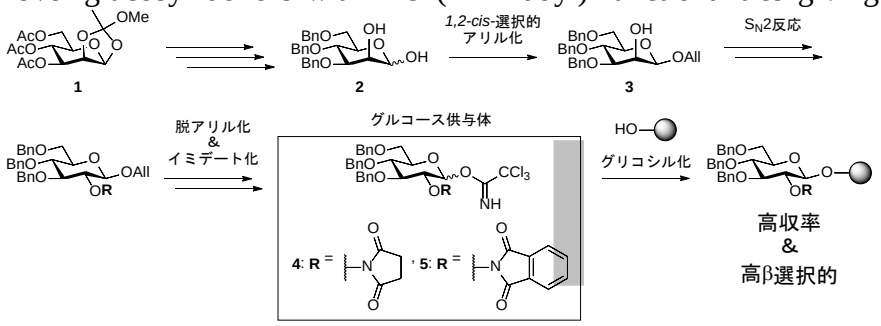
Highly β-selective glycosylation with 2-*O*-(*N*-imidoyl)-protected glucosyl donors

○浅野 剛志[1]、宇田川 太郎[2]、河村 奈緒子[3,4]、安藤 弘宗[3,4]、田中 秀則[3,4] ([1]岐阜大・応用生物、[2]岐阜大・工、[3]岐阜大・G-CHAIN、[4]東海国大機構・iGCORE)

○ Tsuyoshi ASANO[1], Taro UDAGAWA[2], Naoko KOMURA[3,4], Hiromune ANDO[3,4], Hide-nori TANAKA[3,4] ([1]Dept. Appl. Bioorg. Chem., Gifu Univ., [2]Dept. Chem. Biomol. Sci., Gifu Univ., [3]G-CHAIN, Gifu Univ., [4]iGCORE, THERS)

【背景・目的】糖鎖合成において糖と糖を繋ぐグリコシル化反応は最も重要な反応である。近年、保護基の特性を利用した立体選択的なグリコシル化反応の開発が目覚ましい進展を遂げつつある。これまでに様々な保護基を利用した立体選択的グリコシル化反応が開発されてきたが、合成で実用的に使用できる保護基は限られている。我々は、糖鎖合成における保護基の選択肢の拡充を狙い、これまで糖保護基として利用されていなかったアミノオキシ基に着目した。窒素-酸素結合はグリコシル化や保護・脱保護条件において安定であるだけでなく、還元条件で化学選択的に切断できるため、アミノオキシ基は糖鎖合成に適した保護基になりうる。加えて、窒素原子の保護様式で異なる中間体を形成し、グリコシル化反応での立体選択性を制御できる可能性がある。そこで我々は 2 位にアミノオキシ保護基を有するグルコース供与体を合成し、グリコシル化反応での反応性及び立体選択性を検証することを目的とした。【方法・結果】窒素原子の保護様式が異なる 2 位アミノオキシ保護グルコース供与体を効率的に合成するため、2 位水酸基遊離の 1,2-*cis*-*O*-アリルマンノシド **3** を鍵中間体とする合成経路を立案・実施した。マンノースオルソエステル **1** を出発原料とし、3 段階で 1,2-ジオール体 **2** へと導いた。次に、ジオール体 **2** を 1,2-*cis*-選択的アリル化反応に供し、鍵中間体 **3** を得た。続いて、トリフラート体を経由した S_N2 反応で 2 位にフタルイミドオキシ基、スクシンイミドオキシ基をそれぞれ収率よく導入した。その後、アノマー位アリル基の除去、トリクロロアセトイミデート化を行い、2 種類の 2 位 *N*-イミドイル保護グルコース供与体 **4** と **5** の合成に成功した。得られた **4** と **5** をガラクトピラノース受容体とのグリコシル化反応にそれぞれ供したところ、両供与体ともに 0 °C にて高収率かつ高立体選択的に β-グリコシド成績体を与えた。続いて、**4** より高い収率と立体選択性を与えた供与体 **5** の基質適用範囲を検証した結果、幅広い糖受容体に対して高 β 選択的にグリコシド成績体を与えた。最後に、β 選択的グリコシド結合形成が進行する理由をモデル基質中間体の DFT 計算（B3LYP/6-31G*）で解析したところ、擬シスデカリン中間体を経由する反応機構が支持された。

Aminooxy functional groups have never been used as protecting groups in carbohydrate chemistry even though the nitrogen-oxygen bond is stable under acidic conditions for glycosylation and can be cleaved selectively using reductive conditions. Here we developed novel glucosyl donors with 2-*O*-(*N*-imidoyl) functionalities giving excellent yield and β-selectivity in glycosylation. Based on B3LYP/6-31G* DFT simulations, the β-selective glycosylation is speculated to proceed via a pseudo-*cis*-decalin intermediate.



protecting group, aminooxy group, β-glycosylation

発表責任者：田中秀則（hatanaka@gifu-u.ac.jp）

講演番号：3H07-06
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:30～ ミーティングルーム H

アラゴナイトナノファイバー形成に関与するアコヤガイ靭帯の新規酸性ペプチド LICP の構造解析
Structure analysis of novel acidic peptide, LICP, related to the formation of aragonite nanofiber from the ligament of *Pinctada fucata*.

○森岡 太一[1]、岩橋 晴香[1]、池谷 鉄兵[3]、伊藤 隆[3]、片山 秀和[2]、降旗 一夫[1]、永田 宏次[1]、鈴木 道生[1] ([1]東京大院農、[2]東海大工、[3]都立大院理)
○ Taichi MORIOKA[1], Haruka IWAHASHI[1], Teppei IKEYA[3], YUTAKA ITO[3], Hidekazu KATAYAMA[2], KAZUO FURIHATA[1], Koji NAGATA[1], Michio SUZUKI[1] ([1]Tokyo Univ., [2]Tokai Univ., [3]Metropolitan Univ.)

アコヤガイ（*Pinctada fucata*）貝殻の蝶番部分に存在する靭帯は、貝殻開閉のために繊維状の炭酸カルシウムアラゴナイト結晶で形成されている。このようなアラゴナイトナノファイバーは人工的に作ることは難しく、その形成のメカニズムは明らかとなっていない。本研究では、靭帯から発見された 10 個のアミノ酸から成る新規の酸性ペプチドである LICP（Ligament Intra-Crystalline Peptide）の機能と構造解析を行うことで、アラゴナイトナノファイバー形成の分子メカニズムを明らかにすることを目的とした。まず、アミノ酸配列に基づいて LICP を化学合成し精製を行った。合成した LICP を用いて *in vitro* での炭酸カルシウム結晶形成実験を行った。走査型電子顕微鏡（SEM）による観察の結果、短針状のアラゴナイト結晶が観察された。靭帯の形成初期の透過型電子顕微鏡（TEM）の観察により、アラゴナイトナノファイバーは短針状の結晶が連続的に接続することで形成されることが示されていた。このことから、LICP がアラゴナイト結晶の成長を抑え短針状にすることでアラゴナイトナノファイバーの形成に関与することが示唆された。

どのように LICP がアラゴナイト結晶と相互作用し、短針状の形態を誘導するのか明らかにするために、核磁気共鳴法（NMR）を用いてアラゴナイト結晶表面での LICP の構造解析を行った。その結果、LICP は 3、9 残基目のアスパラギン酸と 5 残基目のグルタミン酸の側鎖のカルボキシ基が同一平面上に存在し、それを 8、10 残基目のチロシンが支えるような構造でアラゴナイト結晶内のカルシウムイオンと相互作用していることが明らかとなった。また、LICP の各酸性アミノ酸の側鎖間の距離がアラゴナイト結晶内の 001 面のカルシウムイオンの間隔と一致していたことが明らかとなった。

これらの研究結果により、靭帯内で LICP はアラゴナイト結晶の 001 面のカルシウムイオンと相互作用し、アラゴナイト結晶の *c* 軸方向の成長を制御することで、繊維状の結晶形成に寄与していることが示唆された。

Novel acidic peptide, LICP, was identified from the ligament of *Pinctada fucata*. LICP plays important roles to regulate the formation of aragonite nanofiber in the ligament. To clarify the structure-function relationships of LICP, we used NMR techniques to reveal the 3D structure of LICP binding to the aragonite crystals. Acidic residues at 3rd, 5th and 9th positions were localized in the same plane. The distance between acidic residues was same as that of calcium ions in {001} plane. These results suggested that LICP is related to the crystals growth of aragonite in the direction of *c*-axis.

aragonite nanofiber, Pinctada fucata, calcium carbonate

発表責任者：鈴木道生（amichio@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3H07-07
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:30～ ミーティングルーム H

植物由来抗歯周病菌ペプチドの同定と作用機構解析
Identification and mechanism analysis of a plant peptide that inhibits the growth of *Porphyromonas gingivalis*

○小澤 友弥[1]、張 迷敏[1]、陸 鵬[1]、岡本 研[1]、伊藤 英晃[1]、鈴木 道生[1]、花田 耕介[2]、柘植 尚志[3]、中曽根 光[4]、米倉 円佳[4]、永田 宏次[1]([1]東大院農生科、[2]九工大院生情工、[3]中部大応生、[4]トヨタ自動車・アグリバイオ事業部)
○Tomoya OZAWA[1], Mimin ZHANG[1], Peng LU[1], Ken OKAMOTO[1], Hideaki ITOH[1], Michio SUZUKI[1], Kousuke HANADA[2], Takashi TSUGE[3], Hikaru NAKASONE[4], Madoka YONEKURA[4], Koji NAGATA[1] ([1]The Univ. of Tokyo, [2]Kyutech., [3]Chubu Univ., [4]Toyota Motor Corp.)

植物由来ペプチド約 500 種類からなるライブラリーから、歯周病の主要原因菌 *Porphyromonas gingivalis*（Pg 菌）の増殖を抑制するものを探索した。その結果、最も高い抗 Pg 菌活性を示すペプチドは 20 アミノ酸残基からなり、IC_{50} = 62 μM であった。前半または後半の 10 アミノ酸残基だけでは抗 Pg 菌活性が見られなかった。この高活性ペプチドについて、PBS およびリポソーム存在下で CD スペクトルによる二次構造解析をおこなったところ、PBS 中ではαヘリックス 2.2%、βシート 37%、ターン 14%、その他 47%であったが、リポソーム存在下ではαヘリックスが減少し、βシートが増加していた。蛍光色素を内包したリポソーム用いて、このペプチドによる蛍光色素の漏出を測定した結果、POPC リポソームや POPE:POPG = 4:1 のリポソームからは殆ど漏出を引き起こさなかったが、POPG リポソームや POPC:POPG = 4:1 のリポソームからは漏出を引き起こし、POPG リポソームでは EC_{50} = 30 μM であった。蛍光色素を取り込ませた Pg 菌細胞でも、このペプチドによる蛍光色素の放出が観測され、EC_{50} = 69 μM であった。一方、赤血球を用いた溶血アッセイでは溶血活性は殆ど見られなかった。以上から、このペプチドは Pg 菌の脂質二重膜構造を崩壊させることが示された。

We searched for peptides that suppress the growth of *Porphyromonas gingivalis* (Pg), the main causative agent of periodontal disease, from a peptide library containing about 500 plant-derived peptides. The most active peptide showed anti-Pg activity with an IC_{50} of 62 μM. The peptide consists of 20 residues. Neither the first nor second half of the peptide did not show the activity. The secondary structure analysis of this peptide by CD spectrum indicated the presence of 2.2% α-helix, 37% ß-sheet, 14% turn structure, and 47% other structures in PBS. The α-helix decreased, and the ß-sheet increased in the presence of liposomes. Membrane leakage assay using liposomes indicated that this peptide caused almost no leakage to the liposomes of POPC and POPE:POPG = 4:1. However, it caused leakage to the liposomes of POPG (EC_{50} = 30 μM) and POPC:POPG = 4:1. Membrane leakage assay using Pg cells indicated that this peptide caused leakage (EC_{50} = 69 μM). On the other hand, it showed almost no hemolytic activity. Thus, this peptide shows anti-Pg activity by disrupting the lipid bilayer structure of Pg cells.

Periodontal disease, Antimicrobial peptide, *Porphyromonas gingivalis*

発表責任者：永田宏次（aknagata@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3H07-08
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:30～ ミーティングルーム H

昆虫由来抗菌ペプチドの黄色ブドウ球菌に対する抗菌活性の特性

Characteristics of antibacterial activity of antimicrobial peptide from insects toward *Staphylococcus aureus*

○下田 蒼[1]、伊藤 隼哉[2]、仲川 清隆[2]、安藤 太助[1]、米山 裕[1]([1]東北大院・農・動物微生物学、[2]東北大院・農・機能分子解析学)
○So SHIMODA[1], Junya ITO[2], Kiyotaka NAKAGAWA[2], Tasuke ANDO[1], Hiroshi YONEYAMA[1] ([1]Tohoku Univ. Graduate School of Agricultural Science Animal Microbiology, [2]Tohoku Univ. Graduate School of Agricultural Science Food and Biodynamic Chemistry)

昆虫由来抗菌ペプチド Persulcatusin(IP)はヒト及び家畜感染症の原因菌である黄色ブドウ球菌を含むグラム陽性菌に対して強力な抗菌活性を発揮し、薬剤耐性菌である MRSA(Methicillin resistant *S. aureus*)に対しても抗菌活性を示すことが報告されている。我々は IP に着目した微生物生産手法の確立及び作用メカニズムの解明を研究目的としている。これまでに大腸菌を宿主とした IP 高発現系を導入した形質転換体で生産した組み換え型 IP は黄色ブドウ球菌に対して抗菌活性を示すことを明らかにした。本研究では構造及び作用メカニズムに焦点をあて IP 抗菌活性における特性を検討した。

空気酸化後の IP 分子量が酸化前よりも 6 減少していることから分子内ジスルフィド結合が 3 つ形成されたことが示唆され、黄色ブドウ球菌に対する抗菌活性は 2 倍上昇していた。細胞膜リン脂質にリジン残基を転移させ細胞表層の電荷を変化させる Multiple protein of the peptide resistance factor(MprF)をコードする *mprF* やカチオン性抗菌ペプチドの排出ポンプ遺伝子 *vraD,vraE,vraF* をそれぞれ欠損させた変異株は親株に比べ IP 感受性が上昇した。このことから IP 抗菌活性においてジスルフィド結合、細菌細胞表層電荷さらには排出ポンプの有無が重要な要素であることが示唆された。

Persulacausin (IP), an antimicrobial peptide from insects, shows strong antibacterial activity against Gram-positive bacteria including *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) that causes infection of human and livestock. Furthermore, IP displays activity against methicillin resistant *S. aureus* (MRSA). Previously, we constructed a microbiological production system of IP and revealed that recombinant IP produced by *E. coli* has antibacterial activity against *S. aureus*. In this study, we investigated characteristics of antibacterial activity on IP from the structural viewpoint.

When IP solution was aerially oxidized, the molecular weight of IP was reduced by six as compared to the reduced form as assessed by the ESI-MS analysis, indicating that three intramolecular disulfide bonds were formed. This oxidized form showed twice stronger antibacterial activity than that of the reduced form. Next, we determined the antibacterial activity of IP against several single-knockout mutants (*mprF*, *vraD*, *vraE*, and *vraF*). All these mutants showed hypersusceptibility to IP compared to that of their parent strain. We, therefore, concluded that intramolecular disulfide bonds, bacterial cell surface charges and the presence of transporters are important factor for the IP antibacterial activity against *S. aureus.*

antimicrobial peptides, *Staphylococcus aureus*, insect defensins

発表責任者：下田蒼（so.shimoda.t7@dc.tohoku.ac.jp）

講演番号：3H07-09
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:30～ ミーティングルーム H

動脈硬化症治療薬開発のための新規ペプチド阻害剤の PURE システムと mRNA ディスプレイ法を用いた探索

PURE system-based mRNA display evolution of peptide inhibitors for development of atherosclerosis treatment

○安東 丈洋[1]、冨士 大輔[2]、横山 匠[1]、高守 幸男[1]、堀内 大輔[1]、山本 美月[3]、川上 隆史[4,5] ([1]山梨大院・医工農・生命環境、[2] 山梨大・生命環境・生命工、[3] 山梨大院・医工農・統合応用生命科学、[4]山梨大院・総合研究・生命環境、[5]JST・さきがけ)
○ Takehiro Ando[1], Daisuke Fuji[2], Takumi Yokoyama[1], Yukio Takamori[1], Daisuke Horiuchi[1], Mizuki Yamamoto[3], Takashi Kawakami[4,5] ([1]Dept. Life Environ. Sci., Integr. Grad. Sch. Med. Eng. Agr. Sci., Yamanashi Univ., [2]Dept. Biotechnol., Fac. Life Environ. Sci., Yamanashi Univ., [3]Dept. Integr. Appl. Life Sci., Integr. Grad. Sch. Med. Eng. Agr. Sci., Yamanashi Univ, [4]Fac. Life Environ. Sci., Grad. Fac. Interdiscip. Res., Yamanashi Univ., [5]JST, PRESTO)

動脈硬化症は血中に LDL コレステロールが過剰に蓄積することで起こる高 LDL コレステロール血症が原因の一つとして発症し、心血管疾患、脳血管疾患などの重大な疾患のリスクが高まる。血中に存在する分泌タンパク質である PCSK9 は、LDL コレステロールを血中から細胞内へ取り込む働きを持つ LDL 受容体(LDLR)と相互作用し、分解へ誘導する。これにより、血中からの LDL コレステロールの排除が抑制され、血中に過剰に蓄積するようになる。従って、PCSK9/LDLR 間相互作用を阻害する薬剤の開発が脂質異常症の治療において重要であると考えられる。しかし、現在使用されている抗 PCSK9 抗体医薬品は非常に高価であるという問題点が存在する。そこで本研究では、化学合成が可能で抗体医薬品よりも安価になり得る医薬品の開発を目的とし、PCSK9 を標的とした、PURE システムと mRNA ディスプレイ法を用いた SELEX 法により新規の抗 PCSK9 ペプチド阻害剤を探索した。

Hypercholesterolemia characterized by excessively elevated levels of plasma low-density lipoprotein-cholesterol (LDLc) increases the risk of atherosclerosis, causing cardiovascular disease and cerebrovascular disease. Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) exists in the plasma, is secreted from liver, and interacts with LDL-receptor (LDLR) that uptakes LDLc from the plasma into hepatocytes. The PCSK9/LDLR interaction causes LDLR degradation, resulting in elevation of the LDLc level in the plasma. While anti-PCSK9 antibodies have been widely used as therapeutic atherosclerosis agents, the antibody agents are very expensive because they are produced by mammalian cells. Therefore, development of low-cost PCSK9/LDLR interaction inhibitors that can be produced by chemical synthesis is important for atherosclerosis treatment.

Here, we report the screening of novel peptides that bind to PCSK9 by using the mRNA display evolution based on an *Escherichia coli* reconstituted cell-free translation system (PURE system).

PCSK9, atherosclerosis, LDL-cholesterol

発表責任者：川上隆史（tkawakami@yamanashi.ac.jp）

講演番号：3H07-10
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:30～ ミーティングルーム H

フラボノイド化合物による昆虫ステロイドホルモン生合成酵素 Noppera-bo の阻害：構造生物学的解析と生物活性検定
Inhibition of insect steroid hormone biosynthetic enzyme Noppera-bo by flavonoid compounds: Structural biological analysis and biological activity assay

○海老原 佳奈[1]、稲葉 和恵[1]、小祝 孝太郎[2]、髙谷 大輔[3]、渡邉 千鶴[3]、今村 理世[4]、岡部 隆義[4]、小島 宏建[4]、佐久間 知佐子[5]、嘉糠 洋陸[5]、藤川 雄太[6]、井上 英史[6]、本間 光貴[3]、千田 俊哉[2]、丹羽 隆介[1,7]([1]筑波大・生命環境、[2]高エネ研・物構研・構造生物、[3]理研(BDR) 制御分子設計、[4]東大・創薬機構、[5]慈恵医大・熱帯医学、[6]東京薬大・生命科学、[7]筑波大・TARA セ)
○Kana EBIHARA[1], Kazue INABA[1], Kotaro KOIWAI[2], Daisuke TAKAYA[3], Chiduru WATANABE[3], Riyo IMAMURA[4], Takayoshi OKABE[4], Hirotatsu KOJIMA[4], Chisako SAKUMA[5], Hirotaka KANUKA[5], Yuuta FUJIKAWA[6], Hideshi INOUE[6], Teruki HONMA[3], Toshiya SENDA[2], Ryusuke NIWA[1,7] ([1]Graduate School of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba, [2]Structural biology research center, Institute of Materials Structure Science, High Energy Accelerator Research Organization KEK, [3]Systems and Structural Biology Center, RIKEN(BDR), [4]Drug Discovery Initiative, University of Tokyo, [5]Department of Tropical Medicine, Center for Medical Entomology, The Jikei University School of Medicine, [6]School of Life Sciences, Tokyo University of Pharmacy and Life sciences, [7]Life Science Center of Tsukuba Advanced Research Alliance, University of Tsukuba)

エクジステロイドは、昆虫の発生・生理の調節に重要なステロイドホルモンである。エクジステロイドの生合成酵素や受容体はヒトを含む脊椎動物には存在しない。よって、エクジステロイドの生合成や作用を阻害する薬剤は、環境調和型の昆虫成長制御剤となることが期待される。本研究で我々は、将来的な昆虫成長制御剤の開発を目指して、エクシステロイド生合成を担うグルタチオン *S*-転移酵素 Noppera-bo (Nobo; Enya et al. *Sci. Rep.* 2014) に対する阻害剤の作用機序の解析を実施した。Nobo は ハエ目とチョウ目にのみ保存されていることから、限定された昆虫群に特異的な殺虫剤開発において好適である。今回我々は、ネッタイシマカ *Aedes aegypti* の Nobo の活性を抑制する化合物の阻害剤探索を行った。その結果、IC_{50} (酵素活性を 50%阻害濃度) が 10 μM 以下のフラボノイド骨格を持つ化合物が複数得られた。次に、X 線結晶構造解析を行い、Nobo と 3 種の阻害化合物との複合体構造を明らかにした。得られた複合体構造を基に、類縁化合物を用いて、構造活性相関を評価した。その結果、①Nobo-E113 との水素結合および②化合物の平面性が阻害活性において重要であることが示唆された。さらに、蚊を用いた殺虫試験の結果、Nobo 阻害化合物は蚊に対して殺虫効果を発揮した。今後は、得られた知見を基に、より高い Nobo 阻害活性・殺虫活性を示す阻害化合物のデザインを目指す。

Ecdysteroids are important in the regulation of insect development and physiology. The biosynthetic enzymes and receptors for ecdysteroids are not present in vertebrates, including humans. Therefore, a chemical compound that inhibits the biosynthesis and action of ecdysteroids is expected to be an environmentally-friendly insect growth regulator. In this study, we analyzed the mechanism of action of inhibitors against the ecdysteroidogenic glutathione *S*-transferase Noppera-bo (Nobo; Enya et al. *Sci. Rep.* 2014) with the aim of developing future insect growth regulators. Nobo is conserved only in dipteran and lepidopteran species. In this study, we searched for chemical compounds that inhibit the activity of Nobo in the mosquito *Aedes aegypti*. Several compounds with flavonoid skeletons with IC50s (i.e., concentrations that inhibit 50% of the enzyme's activity) below 10 μM were obtained. Next, the structure of the complexes of Nobo and the three inhibitors was determined by X-ray crystallography. We found that (1) hydrogen bonding with Nobo-E113 and (2) planarity of the compounds are important for the inhibitory activity. Furthermore, the results of the mosquito insecticide test showed that Nobo inhibitors were effective against mosquitoes. In the future, we will aim to design inhibitory compounds with higher Nobo inhibitory and insecticidal activity based on the findings of this study.

X-ray crystal structure analysis, Drug discovery, Mosquito
発表責任者：海老原佳奈（5315010e@gmail.com）

講演番号：3H07-11
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:30～ ミーティングルーム H

大腸菌のパスウェイエンジニアリングによるモノテルペノイド高生産系の構築

Establishment of a monoterpenoid overproduction system by pathway engineering of Escherichia coli

○宮下 孝洋[1,2]、栗栖 尚嗣[2]、角掛 陽[2]、和氣 駿之[2]、中山 亨[2]、高橋 征司[2] ([1]北海道糖業（株）、[2]東北大・院・工)
○Takahiro MIYASHITA[1,2], Naotsugu KURISU[2], Minami TSUNOKAKE[2], Toshiyuki WAKI[2], Toru NAKAYAMA[2], Seiji TAKAHASHI[2] ([1]Hokkaido Sugar Co.,Ltd, [2]Tohoku Univ.)

植物が生合成する代謝産物の一種であるモノテルペノイドは, 食品添加物, 香料, 溶剤などとして広く利用され, 産業的に重要な物質である. しかし, 植物より精製できるモノテルペノイドの量は微量かつ有機合成が困難な構造も含まれていることから, 代謝工学による高生産型生物の構築が進められている. 大腸菌を宿主とする場合は，一般的に，モノテルペン合成酵素（monoTPS）に加え，その基質となるゲラニル二リン酸（GPP）の合成酵素（GPS）を異種発現させるが, その生産性の低さが問題となっていた．その原因の一つとして，GPP が大腸菌内在のファルネシル二リン酸（FPP）合成酵素（FPS）の基質として消費されてしまう点が想定される．そこで本研究では，内在の FPS が欠損した大腸菌を宿主に用い，monoTPS への基質供給効率を増大させることで，より生産性の高いモノテルペノイド生産系の構築を試みた．FPP は必須化合物であるが，予想に反し液体培養時における *FPS* 欠損株の顕著な増殖障害は示されなかった．*FPS* の欠損株及び野生型株において, *Mycobacterium tuberculosis* 由来の GPS と *Angelica archangelica* 由来の monoTPS を誘導的に高発現させ，GC-MS 分析に供した．その結果，単環式モノテルペンである β−フェランドレンの合成酵素と, 非環式モノテルペンである *cis*−β−オシメンの合成酵素のいずれの導入系統においても，*FPS* 野生型株に対して欠損株における目的化合物の生成量が顕著に増大することがわかった．これらの結果より，*FPS* 欠損株を宿主としたモノテルペノイド生産系が有用であることが明らかとなった.

Many of plant-derived monoterpenoids are industrially important as a food additive, flavor, solvent, and so on. Since the amount of terpenoids that can be purified from plants is very small, establishment of a mass production system of valuable monoterpenoids in microorganisms by the metabolic engineering is desired. Generally, to produce monoterpenoids in *Escherichia coli*, exogenous genes encoding geranyl diphosphate (GPP) synthase (GPS) and monoterpene synthase (monoTPS) are introduced. However, due to consumption of GPP as a substrate for endogenous farnesyl diphosphate synthase (FPS), productivity of the system is low. Therefore, in this study, we applied an *E. coli* strain deficient in *FPS* as a host to produce monoterpenoids. As results, a *fps* strain expressing a GPS from *Mycobacterium tuberculosis* and a monoTPS from *Angelica archangelica*, such as β-phellandrene synthase and *cis*-β-ocimene synthase, produced higher amount of target terpenoids than a *FPS* wild-type strain expressing the identical set of genes, indicating this system is useful for monoterpenoid production.

terpenoid, isoprenoid, terpene synthase

発表責任者：高橋征司（seiji.takahashi.a7@tohoku.ac.jp）

講演番号：3H07-12
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:30～ ミーティングルーム H

Clostridium perfringens 由来 Toxin-Antitoxin システム MazEF について：分子認識機構と生理機能の考察

Molecular mechanism and physiological functions of a MazEF module, a well conserved toxin-antitoxin system, in *Clostridium perfringens*

○横田 亜紀子[1]、宮本 龍樹[2]、大田 悠里[1,2]、釣賀 雅子[1]、常田 聡[2]、野田 尚宏[1,2]（[1]産総研・バイオメディカル、[2]早稲田大院・先進理工）
○Akiko YOKOTA[1], Tatsuki MIYAMOTO[2], Yuri OTA[1,2], Masako TSURUGA[1], Satoshi TSUNEDA[2], Naohiro NODA[1,2] ([1]BMRI, AIST, [2]Grad. Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ.)

微生物に普遍的に存在し、ストレス応答に関与するとされるトキシン-アンチトキシン（TA）システムは、平常時にはアンチトキシンにより中和されていたトキシンの活性が、ストレス条件下においては活性化し、細胞内の標的分子を攻撃し、様々な細胞プロセスを妨害する、という機構である。すなわち、TA システムに関する知見の獲得は、細胞の成長阻害や休眠など、その微生物の薬剤寛容機構に対する深い理解に繋がることが期待される。本研究では、病原菌 *Clostridium perfringens* 由来トキシン $MazF_{cpe}$ と、そのアンチトキシン $MazE_{cpe}$ に着目し、それらの分子認識機構を解析して生理機能を解明することを目指した。

MazF は RNA を標的として配列特異的に切断するトキシンタンパクである。大腸菌システムで発現し、精製した $MazF_{cpe}$ を用いて基質 RNA を切断した。その断片の配列データを次世代シーケンサーにより取得し、基質 RNA 配列上にマッピングして切断部位を解析し、推定された切断配列に対する $MazF_{cpe}$ の活性を蛍光消光アッセイで厳密に検証した。また、$MazE_{cpe}$ が $MazF_{cpe}$ の RNA 切断活性を中和することも確認した。さらに *C. perfringens* ゲノム上の遺伝子における $MazF_{cpe}$ の切断配列の出現頻度を、$MazF_{cpe}$ 発現時に各遺伝子が受ける翻訳阻害度の指標とみなし、その生理機能を考察した。

Bacterial toxin-antitoxin (TA) systems play important roles in stress-responses. Under normal conditions, toxin activities are inhibited by antitoxins. Under stressful conditions, toxins are activated and interfere with various cellular processes, leading to the microbial low metabolic states referred to as “VBNC” and/or “dormancy”. Insights into TA systems would be a key to understand the mechanisms how microbes acquire antibiotic tolerance. To understand the molecular mechanism and physiological functions of TA systems, we focused on $MazE_{cpe}$ and $MazF_{cpe}$, one of TA pairs conserved in a pathogenic microbe of *Clostridium perfringens*. We prepared a sequence-specific endoribonuclease toxin of $MazF_{cpe}$ and its antitoxin of $MazE_{cpe}$ and investigated their enzymatic activities. Using a modified RNA-Seq and a fluorometric assay, we identified the target sequence specifically cleaved by $MazF_{cpe}$. Further, we analyzed frequencies of this motif in each CDS of *C. perfringens* genome, to evaluate the potential effect of $MazF_{cpe}$-cleavage on transcripts in this organism.

toxin-antitoxin system, sequence-specific endoribonuclease, massive parallel sequencing

発表責任者：野田　尚宏（noda-naohiro@aist.go.jp）

講演番号：3H07-13
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:30～ ミーティングルーム H

抗体工学を利用した二重交差性自己抗体の解析

Analysis of cross-reactive autoantibodies based on antibody-engineering

○阿南 優佑[1]、佐々木 栄太[1]、板倉 正典[1]、上田 宏[2]、内田 浩二[1] ([1]東大院農生科、[2]東工大科学技術創成院)
○Yusuke ANAN[1], Eita SASAKI[1], Masanori ITAKURA[1], Hiroshi UEDA[2], Koji Uchida[1] ([1]Grad. Sch. Agric. and Life Sci., Univ. of Tokyo, [2]Inst. Innov. Res., Tokyo Tech)

過酸化脂質は、タンパク質や核酸などの生体分子と反応することで、さまざまな疾病に関与する。我々はこれまでに、自己免疫疾患の全身性エリテマトーデス (SLE) モデルマウス血清中において、過酸化脂質 4-oxo-2-nonenal (ONE) 修飾タンパク質に対する抗体価の上昇を確認し、そのモノクローナル抗体を作製した。さらに、その抗体は DNA に対しても交差性を示すことを見出した。本研究では、ファージディスプレイ法を用いてさらなる ONE/DNA 二重交差性抗体を作製し、その生理的・病態生理学的意義を解明することを目的とする。まず SLE モデルである MRL-*lpr* マウス由来のファージ抗体ライブラリを作製した。スクリーニングの結果得られた 8 種類の抗体は、すべて ONE 修飾タンパク質と DNA の両方に結合した。さらに、これらの抗体について抗体可変領域 (V_H、V_L ドメイン) のみを発現し、親和性解析を行ったところ、全ての V_H ドメインが両方の抗原と結合した。一方、全ての V_L ドメインはどちらの抗原にも結合しなかったことから、ONE/DNA 二重交差性抗体は V_H ドメインによって 2 つの抗原を認識していることが明らかとなった。また、これらの抗体はグアニン/シトシンの連続する二本鎖 DNA と強く結合することがわかってきている。さらに現在、二重交差性 V_H ドメインが認識する ONE 修飾構造の解析を行っており、二重交差性抗体がそれぞれの抗原と結合する分子メカニズムの解明を目指している。

Lipid peroxides are known to be involved in many diseases by reacting with endogenous molecules such as proteins and DNA. We previously found that the antibody titer against proteins modified with 4-oxo-2-nonenal (ONE), one of the representative peroxidized lipid products, were increased in systemic lupus erythematosus (SLE) model mice. Interestingly, the anti-ONE monoclonal antibodies, which we produced by hybridoma technology, showed cross-reactivity against DNA. Here, we produced more antibodies based on phage display technology to elucidate physiological and pathophysiological functions of the ONE/DNA cross-reactive antibodies. We first prepared a phage library displaying single chain variable fragments (scFvs) of antibodies from SLE-prone MRL-*lpr* mice and identified 8 scFvs, which bound to both ONE-modified proteins and DNA. Next, we expressed V_H and V_L single domains of the obtained scFvs and evaluated the individual affinity to the antigens. While all the V_L domains didn't show significant affinity to either antigens, all the V_H domains bound to both antigens. We are now trying to determine the epitope structures of the antigens recognized by the anti-ONE/DNA antibodies to elucidate the molecular mechanism of the observed cross-reactivity.

Phage display, Antibody, Lipid peroxidation

講演番号：3H07-14
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:30～ ミーティングルーム H

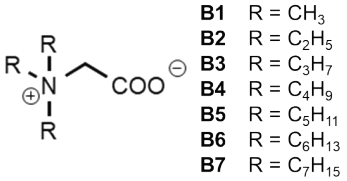
ベタイン型添加剤の共担持による酵素担持検査紙の保存安定性の向上

Improvement of long-term stability of enzymes immobilized on paper-based devices by co-adsorption of betaine derivatives

○青木 拓真[1]、山本 真史[2]、北村 武大[2]、森田 祐子[2]、甲元 一也[1]（[1]甲南大 FIRST、[2]第一工業製薬（株））
○ Takuma AOKI[1], Masahumi YAMAMOTO[2], Takeo KITAMURA[2], Yuko MORITA[2], Kazuya KOUMOTO[1] ([1]Konan Univ., [2]DKS)

患者のそばで迅速な検査を行う Point of care testing が普及する中、酵素を担持したペーパーデバイスに注目が集まっている。酵素は夾雑物を含む生体試料の分析に適しているが、熱や乾燥によって機能を失うため、デバイスの作製や保存に問題を抱えている。我々の研究室では、水溶液中の酵素を失活抑制できるベタイン型添加剤を開発し、その安定化効果について報告してきた。本研究では、そのベタイン型添加剤がペーパーデバイス（濾紙）上の酵素の安定性に及ぼす影響について評価した。

濾紙に担持する酵素として検査紙で汎用される西洋ワサビ由来のペルオキシダーゼ（HRP）を選択した。ベタイン型添加剤を含んだ HRP 溶液を濾紙に滴下し、恒温乾燥することで作製した HRP 担持濾紙を用いて酵素反応を行ったところ、ベタイン型添加剤の構造依存的、添加濃度依存的な酵素安定化が起こることが明らかとなった。特に 100 mM のベタイン型添加剤（B4）を共担持した場合、非添加時の約 3.7 倍もの活性を保持することが明らかとなった。また保存安定性を評価したところ、非添加時では 3 日後には酵素が完全に失活したのに対し、既存添加剤（α-シクロデキストリン）を共担持させた場合はその活性が 34%残存した。一方、B4（100 mM）を共担持させると、残存活性が 83%も残存した。ベタイン型添加剤による濾紙上酵素の安定化は二種類以上の酵素を担持させた場合でも確認され、実際に用いられる酵素検査紙の保存安定性の向上に利用できることが期待される。



Enzymes on paper-based devices easily lose the function during heating and drying which is a common process to make paper-based devices. We recently found and reported unique betaine-type additives, which stabilize enzymes in aqueous solution against denaturation. In this study, we applied them to stabilization of immobilized enzymes on paper-based devices. Co-immobilized betaines exhibited structure- and concentration-dependent stabilization for the enzymes. In particular, B4 showed about 3.7-folds higher activity. The enzyme activity in the absence of additives was completely lost for 3 days, and that in the presence of α-cyclodextrin was 34%. Interestingly, co-immobilized B4 exhibited high activity, 83% of enzyme was still active after 3 days. We believe that betaines are useful for the long-term stabilization of enzymes on the paper-based devices.

betaine, paper-based device, enzyme stability

発表責任者：甲元　一也（koumoto@konan-u.ac.jp）

講演番号：3H07-15
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:30～ ミーティングルーム H

抗菌剤包接 r-グルカンナノ粒子の抗菌活性

Antibacterial activity of antibacterial reagents taken into r-glucan nanoparticles

○畦﨑 梨花、甲元 一也（甲南大 FIRST）
○RIKA UNESAKI, KAZUYA KOUMOTO (Konan Univ.)

難水溶性の医薬品のバイオアベイラビリティを向上させる添加物として、その水溶性を高めるための添加物が用いられている。そこでは界面活性剤やシクロデキストリンなどが用いられ、水溶性を改善することで医薬品の薬効が高まることが報告されている。我々の研究室では最近、三重鎖構造を変性させた変性 β－１，３－１，６－グルカンナノ粒子（ｒ―グルカン）を用いた包接分散法を開発した。この分散法を用い、昨年の年次大会ではシクロデキストリンで可溶化が難しいセフォペラゾン、クラリスロマイシン、エリスロマイシンをｒ―グルカンに包接させることに成功し、その複合体に抗菌活性が発現したことを報告した。しかし、他の抗菌剤や抗菌活性の作用機構については明らかとできていなかった。そこで本研究では、他の難水溶性の抗菌薬とｒ―グルカンの包接複合体を調製し、その抗菌活性ならびに抗菌機構ムについての評価を行った。今回は前回報告した 3 種類の抗菌剤に加え、新たにアモキシシリン、セフジニル、レボフロサキシンとｒ―グルカンとの包接複合体を調製した。水に溶解させた包接複合体としても、アセトンのような水系有機溶媒に溶かして添加した際と同様の抗菌活性を確認することができたことから複合体に取り込まれても抗菌活性を失わず発現することが示された。講演ではそれらの包接挙動や菌に対する作用機構について詳細を報告する。

To improve the bioavailability on poorly water-soluble drugs, water solubilization technique is getting important. We recently reported an unique solubilization method for poorly water-soluble molecules using renatured β-1,3-1,6-glucan nanoparticles (r-glucan NPs). At last conference, we reported that r-glucan NPs can incorporate antibacterials (cefoperazone, clarithromycin, and erythromycin) and the complexes show the antibacterial activity. In this study, we investigated the applicability to other antibacterials and the antibacterial mechanism. As a result, not only cefoperazone, clarithromycin and erythromycin but also other antibacterials (amoxicillin, cefdinir, levofrosaxin) can be taken into the r-glucan NPs. Furthermore, the inclusion complex dissolved in water exhibited high antibacterial activity, as that dissolved in organic solvent.

β-1,3-1,6-glucan, antibacterial agent, inclusion complex

発表責任者：甲元一也（koumoto@s.konan-u.ac.jp）

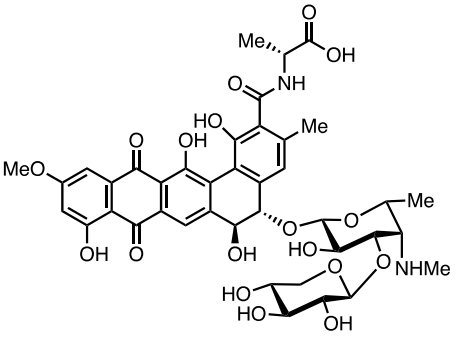
講演番号：3I01-01
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:00～ ミーティングルーム I

O-マンノシル化セリン/スレオニンに対するプラディミシン A の結合評価

Binding evaluation of pradimicin A for *O*-mannosyl serine/threonine

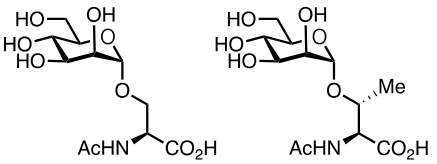
○音田 昂志[1]、小鹿 一[1]、五十嵐 康弘[2]、伊藤 幸成[3,4]、中川 優[1,3,5]([1]名大院・生命農、[2]富山県大・生工、[3]理研、[4]阪大院・理、[5]iGCORE)
○Koshi Onda[1], Makoto Ojika[1], Yasuhiro Igarashi[2], Yukishige Ito[3,4], Yu Nakagawa[1,3,5] ([1]Nagoya Univ., [2]Toyama Prefectural Univ., [3]RIKEN, [4]Osaka Univ., [5]iGCORE)

近年，セリンあるいはスレオニン残基の側鎖ヒドロキシ基にマンノース (Man) が付加された糖タンパク質が数多く見出されており，その生物学的機能に注目が集まっている。しかしながら，このような Man 結合型糖タンパク質を簡便に検出する手法は確立されていない。本研究では，Man に結合する天然色素 pradimicin A (PRM-A) が Man 結合型糖タンパク質の検出に利用できるかどうかを検討するため，Man が付加したセリン (**1**) およびスレオニン (**2**) に対する PRM-A の結合能を評価した。



Pradimicin A (PRM-A)

チオマンノシドを用いたグリコシル化によって **1** を合成し, PRM-A との結合を共沈殿試験によって評価した。その結果，PRM-A は単糖の Man と同様に **1** と結合することが確認された。一方で，PRM-A は Man が付加されていないセリンやグルコース (Glc) とは結合しなかったことから, PRM-A はマンノース部分を認識して **1** と結合していることが明らかとなった。本結果は，セリン残基に Man が付加された糖タンパク質の検出に PRM-A が利用できる可能性を示唆するものである。現在 **2** の合成も進めており，その共沈殿試験の結果も併せて報告する。



Despite the emerging biological and pathological significance of post-translational *O*-mannosylation of serine/threonine residues in proteins, there is a lack of detection methods of mannosylated proteins. In this study, we evaluated binding of pradimicin A (PRM-A), a mannose-binding natural pigment, for mannosylated serine (**1**) and threonine (**2**) as a preliminary study toward the future application of PRM-A in the detection of mannosylated proteins. Co-precipitation experiments confirmed that PRM-A can bind to **1** but not to serine and glucose, suggesting that PRM-A holds promise as a staining agent for mannosylated serine-containing glycoproteins. Synthesis and binding evaluation of **2** will be also presented in this meeting.

Pradimicin, carbohydrate recognition, *O*-mannosylation

発表責任者：中川優（yu@agr.nagoya-u.ac.jp）

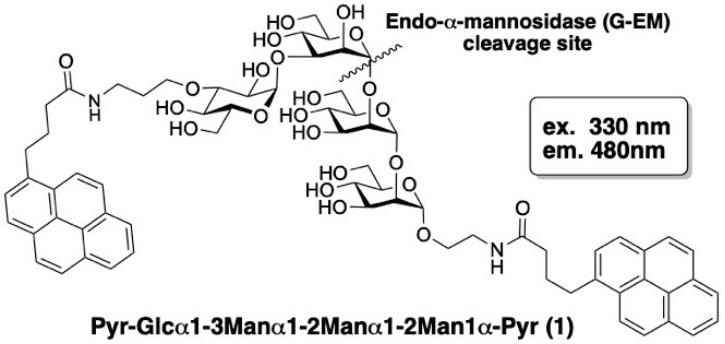
講演番号：3I01-02
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:00～ ミーティングルーム I

ピレン修飾 4 糖プローブを用いた endo-α-mannosidase 活性検出

Measurement of endo-α-mannosidase activity using pyrene modified tetrasaccharide probe

○松尾 一郎[1]、佐野 加苗[1]、石井 希実[1]、黒岩 歩実[1]、森口 朋尚[1]、栗原 大輝[2]、戸谷 希一郎[2]（[1]群馬大院理工、[2]成蹊大理工）
○Ichiro Matsuo[1], Kanae Sano[1], Nozomi Ishii[1], Ayumi Kuroiwa[1], Tomohisa Moriguchi[1], Taiki Kuribara[2], Kiichiro Totani[2] ([1]Gunma Univ., [2]Seikei Univ.)

ピレン分子の会合体は、ピレンモノマーが通常 375nm 付近に発光極大波長があるのに対し、より長波長域の 475nm 付近にエキシマー蛍光を発する。そこで我々は、シスゴルジに局在する糖加水分解酵素：ゴルジ エンド-α-マンノシダーゼ（G-EM）の活性検出基質として、G-EM の基質となる 4 糖（Glcα1-3Manα1-2Manα1-2Man）の還元末端部分と非還元末端部分に対し、ピレン基を導入した 4 糖ジピレン誘導体（**1**）をデザイン、合成した。



プローブ **1** の蛍光スペクトルを測定した結果、480 nm に発光極大波長が検出されたことより、プローブ上のピレン基は会合体を形成していることが明らかとなった。得られた **1** に対して G-EM を作用させた結果、480 nm のエキシマー蛍光が減少するとともに、375nm 付近のピレン単量体の蛍光強度の増加が確認された。以上の結果より、エキシマー蛍光を利用することで、G-EM の糖加水分解活性をマイクロプレートリーダにより追跡、高感度に検出できることが明らかとなった。

Endo-α-mannosidase (G-EM) hydrolyses an internal bond within glucosylated oligomannose type *N*-glycans to liberate a mannose moiety flanked by at least one glucosyl moiety. Due to this substrate specificity, G-EM is presumed to play an important role in the post-endoplasmic reticulum (ER) quality control pathway. In this study, we report the synthesis of a novel excimer-based probe for the detection of G-EM activity. The probe (**1**) was labeled with pyrenes at the non-reducing end and the reducing end of the tetrasaccharide derivative, which was hydrolyzed by G-EM, resulting in decreased excimer emission intensity (480 nm) and increased monomer fluorescence (375 nm). By using this probe, the activity of G-EM can detect easily, with high sensitivity, and with high throughput using a microplate reader.

Endo-α-mannosidase, molecular probe, Pyrene excimer

発表責任者：松尾一郎（matsuo@gunma-u.ac.jp）

講演番号：3I01-03
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:00～ ミーティングルーム I

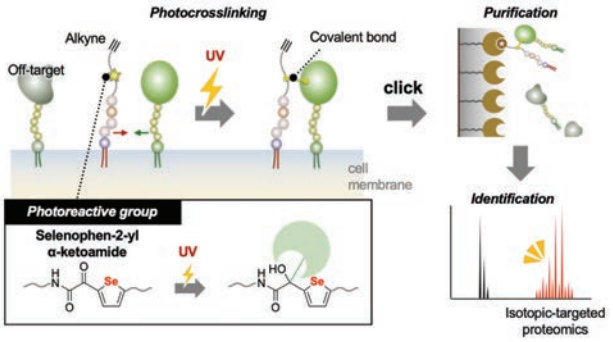
新規光反応性基「セレノフェン-2-イル置換型α-ケトアミド」を用いた光親和性スフィンゴ糖脂質プローブの開発と細胞膜ラフト親和性相互作用の理解に向けた応用

Development of photoaffinity glycosphingolipid probes for understanding raft-associated interactions in the cell membrane by utilizing a novel photoreactive group 'selenophen-2-yl-substituted α-ketoamide'

○浅野 早知[1,2]、田中 秀則[2,3,4]、今村 彰宏[1,2]、石田 秀治[1,2,3,4]、矢木 宏和[5]、加藤 晃一[5,6]、水上 大輝[7]、平井 剛[7]、安藤 弘宗[2,3,4] ([1]岐阜大・応用生物、[2]岐阜大院・連合農学、[3]東海国大機構・iGCORE、[4]岐阜大・G-CHAIN、[5]名市大・院薬、[6]自然科学研究機構・生命創成探究セ、[7]九大院・薬)
○ Sachi ASANO[1,2], Hidenori TANAKA[2,3,4], Akihiro IMAMURA[1,2], Hideharu ISHIDA[1,2,3,4], Hirokazu YAGI[5], Koichi KATO[5,6], Daiki MIZUKAMI[7], Go HIRAI[7], Hiromune ANDO[2,3,4] ([1]Dept. Appl. Bioorg. Chem., Gifu Univ., [2]United Grad. Sch. Agr. Sci., Gifu Univ., [3]iGCORE, THERS, [4]G-CHAIN, Gifu Univ., [5]Grad. Sch. Pharm., Nagoya City Univ., [6]ExCELLS, NINS, [7]Grad. Sch. Pharm. Sci., Kyushu Univ.)

【目的】スフィンゴ糖脂質 (GSL) は、タンパク質や脂質分子との側方の相互作用により細胞内シグナル伝達の足場となる微小ドメインを形成し、ウイルス感染や免疫機構などに重要な役割を果たすことが知られている。従って、細胞膜分子間相互作用の意義を理解することは、生体機能を理解する上で重要な課題である。FRET や一分子追跡による解析法は、動的な分子間相互作用を知る方法として広く利用されているが、多くの GSL のラフト親和性タンパク質は未解明であるため、決められた分子間の相互作用を観察するイメージングによる手法を適用出来ない。本研究では、光親和性 GSL プローブの開発を行い、未知タンパク質の細胞膜上での捕捉・同定法の確立を目指すこととした。
【方法・結果】細胞膜外界における親水環境及び糖-タンパク質の弱い相互作用を考慮し、疎水性が低く選択性の高い光反応性基を選別した。近年報告されたチエニル型 α-ケトアミド構造[1]に倣い、同位体組成を利用したプロテオミクス解析を可能とする新規光反応性基「セレノフェン-2-イル型 α-ケトアミド」の開発に着手した。水中及び光安定性の評価、コンカナバリン A と α-マンノシドの相互作用をモデルとした ITC による結合解析、光親和性標識実験により、チエニル型と同様の安定性を有し、優れた標識化効率を示した。GSL への導入を指向し、光反応性基をアルキン及び親水性のスペーサーで連結した光反応性基ユニットの合成を行い、ガングリオシド GM3 と結合させプローブへと導いた。A549 細胞膜上における光架橋実験とプロテオミクス解析を行い、17 種類のタンパク質が同定された。

We have been developing the photoaffinity probes of glycosphingolipids to identify the raft-associated proteins in the cell membrane. In the present study, we newly developed selenophen-2-yl α-ketoamide as a photoreactive group and a tag for isotope-targeted proteomics. The derivative showed similar photoproperty and photoreactivity to those of the reported 2-thienyl type [1], which features less hydrophobicity and higher selectivity. Photocrosslinking in A549 cell membrane and proteomic analysis were performed using photoaffinity GM3 probe, identifying seventeen of GM3-associated proteins.



[1] Ota, E. *et al. ACS Chem. Biol*. **2018**, *13*, 876–880.

glycosphingolipid, photoaffinity labeling, proteomics
発表責任者：安藤　弘宗（hando@gifu-u.ac.jp）

講演番号：3I01-04
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:00～ ミーティングルームⅠ

フコース含有糖タンパク質合成を目指した糖水酸基保護基の検討

Study for protecting group of sugar alcohols toward synthesis of fucosylated glycopeptide

○安藤 達也[1,2]、朝比奈 雄也[1]、北條 裕信[1] ([1]阪大蛋白研、[2]阪大院理)
○Tatsuya ANDO[1,2], Yuya ASAHINA[1], Hironobu HOJO[1] ([1]Inst. Protein Res., Osaka Univ., [2]Grad. Sch. Sci., Osaka Univ.)

L-フコース(Fuc)は、糖タンパク質糖鎖の構成単糖の１つである。フコース含有糖タンパク質は、様々な生命現象と関連付けられており、天然物合成の観点からも興味深い標的分子である。デオキシ糖であるフコースは、通常のヘキソースに比べ、グリコシド結合の酸感受性が高く、容易に加水分解する。この特徴は、フコース含有糖タンパク質の合成を行うにあたり、大きな問題となる。なぜなら、ペプチド固相合成法の最終段階で行われるトリフルオロ酢酸(TFA)処理時に、同時にフコシド結合の分解が懸念されるためである。先行研究では[1]、フコース水酸基の保護体系により、フコシド結合の酸安定性が変化すると報告されている。そこで、本研究では、第一に保護体系とフコシド結合の酸安定性の変化傾向を詳細に明らかにすることとした。様々なアジドプロピルフコシドを調製し、プロパルギルペプチドと Huisgen 環化付加反応を行うことで、フコース水酸基が様々な保護様式で保護された擬糖ペプチドを得た。これら糖ペプチドを TFA 処理し、フコースの加水分解量を分析した。この検討により、種々の電子吸引性保護基を導入することで、フコシド結合に適切な酸安定性が付与されることを見出した。この結果を元に、適切な保護様式を施したフコースを含む２糖を調製し、アスパラギン酸とカップリングすることで２糖アミノ酸ユニットへ誘導し、さらにこのユニットをペプチド固相合成法へ応用し、TFA 処理、及びフコースの脱保護を検討した。

L-Fucose is one of components in a glycan chain of glycoproteins. The fucosylated glycoproteins have various roles in living cells and are attractive as a synthetic target of natural products. The glycosidic linkage of fucose is more instable than that of hexose under acidic conditions. This acid instability makes the chemical synthesis of the fucosylated glycopeptides challenging, because trifluoroacetic acid treatments used for final step of solid phase peptide synthesis cleaves the acid sensitive fucosidic bonding. In the previous report, the acid stability of fucosidic bonding depended on the protection scheme of hydroxy groups of the fucose [1]. Thus, in this study, we explored suitable protection scheme of fucose hydroxy groups and considered actual glycopeptide synthesis by a novel protection scheme of fucose.

[1] Kunz, H.; Unverzagt, C.; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1988**, *27*, 1697-1699.

glycopeptide, fucose, protecting group

講演番号：3I01-05
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:00～ ミーティングルーム I

チオエーテルを持つ糖受容体を用いた立体選択的グリコシル化の反応機構

Reaction mechanism of stereoselective glycosylation using thioether-carried glycosyl acceptor

須田 栞[1]、田中 萌瑛[1]、杉橋 葵[1]、西田 芳弘[1,2]、○土肥 博史[1,2] ([1]千葉大院園芸、[2]千葉大分子キラリティーセンター)
Shiori SUDA[1], Moe TANAKA[1], Aoi SUGIHASHI[1], Yoshihiro NISHIDA[1,2], ○Hirofumi DOHI[1,2] ([1]Chiba Univ., [2]MCRC)

近年のグリコシル化法の発展により様々なグリコシド結合が形成可能となったが、1,2-*cis* 型グリコシドの形成は依然として困難を伴う。当研究室では、糖受容体の反応点近傍にチオエーテル基をもつ保護基を導入することでグリコシル化における 1,2-*cis* 選択性が大幅に向上することを報告してきた。本研究では、様々なチオエーテル型保護基を反応点近傍に導入した糖受容体を用いてグリコシル化を行い、本 1,2-*cis* 選択的グリコシル化の反応機構を明らかとしたので報告する。

o-メチルチオベンゾイル（2-MTBz）基のチオエーテルをスルホキシドに酸化した糖受容体を用いてグリコシル化を行ったところ、2-MTBz 体に比べて 1,2-*cis* 選択性が大きく低下した。続いて、2-（*p*-メトキシフェニルチオ）アセチル基を導入した糖受容体では 2-（メチルチオ）アセチル基を持つものに比べて 1,2-*cis* 選択性が向上した一方、2-（*p*-ニトロフェニルチオ）アセチル基を導入したものは低下した。これらの結果から、硫黄原子の求核性が立体選択性に深く関与していることが明らかとなった。続いて、2-MTBz を導入した受容体を用いて低濃度で反応を行ったところ、1,2-*cis* 選択性が大幅に向上した。さらに、環状アセタールをもつ糖受容体を用いて反応を行うと 1,2-*cis* 選択性が明らかに低下し、また糖供与体のアグリコンの立体配置は立体選択性に影響を与えないことがわかった。以上のことから、本反応はまず糖供与体から生じたオキソカルベニウムイオン中間体に糖受容体の硫黄原子が付加することで糖供与体－糖受容体複合体が生成し、逆アノマー効果により安定化を受ける β 型複合体においてアルコールが分子内で S_N2 様に反応すると予想した。

Previously we have reported a novel 1,2-*cis* selective glycosylation method using thioether-carried glycosyl acceptor. For detail mechanistic study of this glycosylation, we prepared a series of glycosyl acceptors with thioether groups and conducted them into glycosylations under various conditions. A series of glycosylation reactions indicated that nucleophilicity of sulfur atom in thioether group greatly affect the 1,2-*cis* selectivity, and that oxocarbenium ion generates in early step but glycosylation proceeds under S_N2 mechanism. From these results, we expected a reaction mechanism as follows: thioether of glycosyl acceptor firstly attacks to an oxocarbenium ion intermediate to form a conjugate and intramolecular S_N2-like glycosylation is occurred in a β-form conjugate stabled by reverse anomeric effect.

glycosylation, carbohydrates, chemical synthesis

発表責任者：土肥博史（hdohi@faculty.chiba-u.jp）

講演番号：3I01-06
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:00～ ミーティングルーム I

Inhibition of ApoE3-mediated cellular uptake of lipid nanoparticles by membrane-anchored lipopeptides

○Masaya NANAHARA[1,2], Masaharu SOMIYA[2], Shun'ichi KURODA[1,2] ([1]Graduate School of Frontier Biosciences, Osaka Univ., [2]Institute of Scientific and Industrial Research, Osaka Univ.)

Hepatitis B virus (HBV) uses the N- myristoylated pre-S1 region of its envelope L protein for entering to human hepatocytes via their sodium taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP). Bulevirtide, a lipopeptide equivalent to N-myristoylated pre-S1(2-48) (herein, Myr47) has been approved in the EU as an antiviral drug for the treatment of chronic hepatitis D (in the presence of hepatitis B). While Myr47 binds and inactivates NTCP, preventing the entry of both viruses to hepatocytes, we found that Myr47 inhibits the uptake of HBV subviral particle (HBsAg; deploying the envelope proteins identical to HBV's) by human hepatic cells (HepG2 cells) in the absence of NTCP expression (Somiya et al., Virology. (2016) 497:23-32.).

In this study, we found that Myr47 inhibits liposome uptake as well. By using Myr47 and its mutant peptides, the inhibitory activity was found to be dependent on its N-terminal myristoylation, but not on its amino acid sequence. To elucidate how Myr47 inhibits the cellular uptake of HBsAg and liposomes, the interaction of HBsAg/liposomes with apolipoprotein E3 (ApoE3) was investigated. Apolipoprotein interacts with lipids in the bloodstream to promote the cellular uptake of lipoprotein particles by scavenger receptors. Finally, we found that the interaction of ApoE3 on the surface of liposomes (probably HBsAg as well) was efficiently inhibited by My47 and its mutant peptides.

These results suggest that Myr47 and its mutant peptides can repress the formation of the ApoE3-HBsAg/liposome complex (presumably by repeling the access of ApoE3) and then inhibit the cellular uptake of HBsAg/liposomes by heparan sulfate proteoglycan (HSPG) or other scavenger receptors (*see* Figure). It was demonstrated for the first time that N-myristoyl residues of lipopeptides itself act as an inhibitor of cellular uptake of lipid nanoparticles, independent of the peptide sequence.

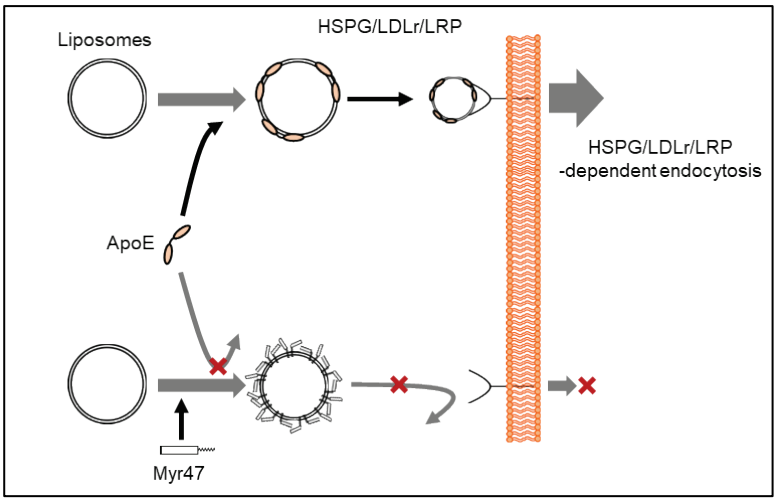


Figure: Effect of Myr47 in the ApoE3-liposome complex formation

lipopeptide, apolipoprotein

講演番号：3I01-07
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:00～ ミーティングルーム I

無細胞タンパク質共翻訳によるショウジョウバエのヌクレオソーム再構築

In vitro *Drosophila* nucleosome assembly by cell-free protein co-expression method

○沖宗 慶一[1]、幡谷 省悟[2]、松本 一樹[1]、後潟 夏菜子[1]、高須賀 太一[1,2] ([1]北大院国際食資源、[2]北大農)
○Keiichi OKIMUNE[1], Shogo HATAYA[2], Kazuki MATSUMOTO[1], Kanako USHIROGATA[1], Taichi TAKASUKA[1,2] ([1]Hokkaido Univ. GFR, [2]Hokkaido Univ.)

真核生物の核内において、クロマチン構造はヒストンタンパク質の翻訳後修飾に伴い変化し、エピジェネティックな遺伝子制御に関与することが知られているが、その詳細な分子機構は明らかになっていない。この要因の一つに試験管内での反応基質となり得る、天然構造を持つ未修飾クロマチン及びその基本構成因子であるヌクレオソームの再構築法がないことが挙げられる。そこで、私たちは、これまでにモデル生物の一つであるショウジョウバエ、さらにヒトのクロマチンについて、コムギ無細胞タンパク質合成法を利用した新規試験管内再構築法を確立した（Okimune et al.,2020)。本研究では上記の反応基質としての利用を見据え、新たにモノヌクレオソームの試験管内再構築ならびに精製を行った。その結果、鋳型 DNA（Widom 601 配列）存在下での四種のヒストンタンパク質（ヒストン H4 の N 末に His-tag 設計）とヒストンシャペロンの共翻訳による、ワンステップでのタンパク質合成とヌクレオソームの再構築、さらに、His-tag 精製による高純度での精製が可能であることを確認した。再構築されたヌクレオソームは天然構造を保持しており、ヒストンタンパク質のアセチル化、メチル化も確認されていない。以上のことから、試験管内再構築及び精製ヌクレオソームの、ヒストン修飾酵素群の機能同定への利用が期待できる。

In eukaryotic nuclei, the dynamics of chromatin structure and function by histone N-terminus modification contribute to various epigenetic regulations. However, the fundamental molecular mechanism is still elusive due to the lack of an appropriate method producing unmodified and native chromatin/nucleosome as substrates for enzyme assays. We reported a novel chromatin assembly method to reconstitute *Drosophila* and human chromatins using a wheat germ cell-free protein synthesis (Okimune et al.,2020). Aiming for further biochemical applications, in this study, we attempted to reconstitute *Drosophila* mono-nucleosome by co-expressing four core histones, including N-term Histidine tagged H4, and a histone chaperon (Nap1) in the presence of nucleosome positioning sequence, a Widom 601. The assembled nucleosome was successfully purified and was shown to maintain a native like structure. Knowing that neither acetylation nor methylation is added on the assembled nucleosome, our method would produce an appropriate substrate for epigenetic enzyme screening platform.

nucleosome, cell-free protein synthesis, *Drosophila melanogaster*

講演番号：3I01-08
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:00～ ミーティングルーム I

シアノバクテリアにおける多様な Hsp70（DnaK）シャペロン系に関する生化学的解析

Biochemical analysis of various Hsp70/DnaK chaperone machines in cyanobacteria

○光島 豊、仲本 準（埼玉大理工）
○Hiroshi MITSUSHIMA, Hitoshi NAKAMOTO (Dept. of Biochem. Mol. Biol. , Saitama Univ.)

生物種を超えて高度に保存されている分子シャペロンの中で、Hsp70 はとりわけ多様なはたらきをする。例えば、新生（変性）タンパク質の（再）折りたたみの促進、オルガネラへのタンパク質の輸送、タンパク質の分解などの重要なはたらきをする。Hsp70（DnaK）は J タンパク質（Hsp40 あるいは DnaJ）などのコシャペロン（補助因子）と協調してシャペロン作用する。Hsp40 が Hsp70 の ATP 加水分解活性を調節することで、Hsp70 と基質との相互作用や再活性化に寄与することが知られている。バクテリアから真核生物にいたるまで、Hsp70 に比較して、J タンパク質の種類は多く、その構造は多様化している。本研究でもちいたシアノバクテリア *Synechococcus elongatus* PCC7942 には、3 種の DnaK ホモログが存在し、うち 2 種が必須である。また、10 種類の J タンパク質が存在することを我々は明らかにした。*S. elongatus* 7942 は、大腸菌と比較してそのゲノムサイズは小さいものの、より多くの J タンパク質をもっている。これらの多くは、遺伝子重複の結果生じたパラログ遺伝子産物と考えられる。一般に、遺伝子の重複は、生物の多様性と関連することが知られているので、*S. elongatus* 7942 の DnaK、および J タンパク質には機能的多様性がみられると考えた。本研究の目的は、精製した 3 種の DnaK と 5 種の J タンパク質を用いて、それらの間のパートナーシップを生化学的に明らかにすることである。現在までのところ、3 種の DnaK の ATP 加水分解活性やタンパク質安定性に違いがあることがわかった。それぞれの J タンパク質との協調的シャペロン作用についても現在解析中である。

Molecular chaperones play an important role in proteostasis (protein homeostasis). The molecular chaperone Hsp70 (DnaK) cooperates with the co-chaperone J-protein (Hsp40, DnaJ). J-protein regulates the Hsp70 ATPase activity and interaction of Hsp70 with a protein substrate. The cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC7942 has three DnaK homologs, and ten J-proteins. Although the genome size of *S. elongatus* 7942 is smaller than that of *Escherichia coli*, there are more J-proteins in this cyanobacterium. They may be originated from gene duplication. In general, gene duplication is known to be associated with bio-diversity, suggesting that *S. elongatus* 7942 J-proteins are diversified functionally. In this study, we analyzed biochemical partnership between three DnaK homologs and five J-proteins. The ATPase activity of DnaK1 was highest among the three homologs. Furthermore, the partnership is being analyzed in terms of the DnaK ATPase stimulation by a J-protein and reactivation of a denatured protein in a certain combination of a DnaK and a J-protein.

molecular chaperone, Hsp70, Cyanobacteria

発表責任者：仲本準（nakamoto@mail.saitama-u.ac.jp）

講演番号：3I01-09
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:00～ ミーティングルーム I

TNF-α親和性ヒト Tudor ドメインタンパク質変異体の創出

Engineering of human Tudor domain protein with TNF-α affinity

○牧野 祥嗣、宮本 佳奈、伊藤 伸哉（富山県大生物工）
○Yoshihide MAKINO, Kana MIYAMOTO, Nobuya ITOH (Toyama Pref. Univ.)

【目的】レミケードなどの腫瘍壊死因子-α（TNF-α）に高親和な抗体医薬は、関節リウマチに対し劇的な治療効果を発揮する。しかし薬価が高く、患者等への負担が大きい。そこで、抗体ではないがその機能を代替可能なタンパク質を創出し、微生物を用いて安価に生産し利用する試みが進められている。我々は、大腸菌を発現系として生産可能な、TNF-α への結合活性を代替する非抗体タンパク質の創出を目指して研究を進めている。ここでは、ヒト Tudor ドメインタンパク質の改変による、TNF-α への特異的結合活性の創出について報告する。
【方法】ヒト Tudor ドメインタンパク質の２つのループの合計 15 残基を、NNT コドンで置換（Lib1）、または置換・伸展させた(Lib2)、２タイプの遺伝子ライブラリを調製した。TNF-α をリガンドとして、リボソームディスプレー法による選択を４回繰り返した後に、遺伝子を発現ベクターにサブクローニングした。タンパク質を発現生産させ、ELISA、および Biacore を用いて親和性と特異性を解析した。
【結果】96 クローンの発現菌体をランダムに選び、粗抽出液によるモノクローナル ELISA を行ったところ、12 クローンに親和性および特異性が認められた。それらのうち、アミノ酸配列が同一であったものは２クローンであったが、その他のクローンのアミノ酸配列および由来ライブラリ（Lib1 または Lib2）は多様であった。これらのクローンをさらに精製し、評価したところ、親和性および特異性が顕著なクローン TD65 を見出した。Biacore を用いた解析により、TNF-α に対する TD65 の親和性は K_D=7.03x10^{-8} と求められ、また、TNFR1、2 と TNF-α の結合阻害活性も部分的ではあるが認められた。今後は TNFR1、2 と TNF-α の結合阻害活性をより有意とすべく、TD65 をさらに改良する。

[Background and Objective] Therapeutic antibodies, such as Remicade, provides significant therapeutic effects on rheumatoid and other immune disorders. However, the cost of therapeutic antibodies is very high. The low-cost antibody-alternative protein drugs using non-antibody scaffold protein is about to emerge. Here, we report about the creation of TNF-α-binding mutant protein using the human Tudor domain scaffold.
[Results] Two loops of the human Tudor domain were randomized and the two libraries were screened for the binding activity to TNF-α. The selected TD65 mutant showed a 7.03x10^{-8} K_D value and had partial inhibition activity for the binding of TNF-α and TNFRs.

Tudor domain, antibody alternative, scaffold protein

発表責任者：牧野祥嗣（makino@pu-toyama.ac.jp）

講演番号：3I01-10
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:00～ ミーティングルーム I

ペプチドバーコーディング法による抗 GFP ナノボディの結合能に重要な残基の同定

Annotation of important residues for affinity of anti-GFP nanobody using peptide barcoding

○松崎 友星[1]、青木 航[1,2]、植田 充美[1,2] ([1]京大院農、[2]JST-CREST)
○Yusei Matsuzaki[1], Wataru Aoki[1,2], Mitsuyoshi Ueda[1,2] ([1]Graduate School of Agriculture, Kyoto University, [2]JST-CREST)

【背景】当研究室では、遊離状態で抗原結合能を持つナノボディをハイスループットに同定できる新手法「ペプチドバーコーディング法」を開発している[1]。本研究では、ペプチドバーコーディング法のスループットの向上を目的に抗 GFP ナノボディの網羅的なアラニンスキャニングを行い、抗 GFP ナノボディの結合能に重要な残基の同定を目指した。【方法】それぞれ異なるペプチドのバーコードを付加した抗 GFP ナノボディ変異体ライブラリーを、GFP とともにゲルろ過クロマトグラフィー(SEC)に供した。GFP との非結合画分に含まれるペプチドのバーコードを質量分析器で解析した。結合能が減少したと考えられる変異体の kinetics を BIACORE T-200 で測定した。【結果および考察】SEC によって抗原結合性のナノボディ変異体と抗原に結合しないナノボディ変異体とを分離した。回収したフラクションに含まれるペプチドのバーコードを分析したところ、GFP との非結合画分で主に検出されるペプチドのバーコードを 5 つ同定し、結合に重要な残基の一斉同定に成功した。BIACORE T-200 によって、これらの変異体の結合能は WT の抗 GFP ナノボディより大幅に小さいことを確認した。以上の結果より、SEC とペプチドバーコーディング法を組み合わせることで、多数の遊離状態の抗体機能を一斉に評価できることを示した[2]。

[Background] We are developing novel methodology, peptide barcoding, for high-throughput evaluation of affinity of non-immobilized nanobody [1]. Here, we conducted alanine scanning of anti-GFP nanobody to enlarge the throughput of peptide barcoding. [Methods] Anti-GFP nanobody mutants fused with unique peptide barcodes were subjected to size exclusion chromatography (SEC) with GFP. Peptide barcodes derived from non-functional mutants were analyzed by LC–MS/MS. The affinities of the identified non-functional mutants were measured by BIACORE T-200. [Results and discussion] Non-functional mutants were separated from functional mutants by SEC. As a result of LC–MS/MS analysis, 5 peptide barcodes derived from non-functional mutants were simultaneously identified. The 5 mutants were validated to have reduced affinity by BIACORE T-200. These results suggested that peptide barcoding enabled one-pot evaluation of affinities of non-immobilized nanobodies in a multiplex manner [2].

[1] Miyamoto et al., PLOS ONE 14(4): e0215993, 2019.　[2] Matsuzaki et al., submitted.

peptide barcoding, single domain antibody, alanine scanning

発表責任者：松崎友星（matsuzaki.yusei.63w@st.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3I01-11
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:00～ ミーティングルームⅠ

がん細胞選択的遺伝子治療を想定した抗体-膜貫通ペプチド酵素的架橋設計

cell-specific siRNA delivery designed from enzymatic ligation of antibody and cell-penetrating peptide

○中澤 光、安藤 優、三浦 大輔、梅津 光央（東北大院工）
○Hikaru NAKAZAWA, Yu Ando, Daisuke Miura, Mitsuo Umetsu (Tohoku Univ.)

核酸医薬の 1 つである低分子干渉 RNA(siRNA)は，細胞内の mRNA を標的とするモダリティであるが細胞特異性を持たないことから、投与量の増加に伴う副作用が問題になっている。その中で近年，抗体などの分子標的タンパク質に siRNA と静電相互作用できるカチオンペプチドを融合した組換えタンパク質を利用することで siRNA を特異的に細胞まで運搬する研究が報告され始めている。しかしながら、カチオンペプチドを融合すると発現タンパク質を可溶性画分として取得できない傾向が報告されている。そこで本研究では、抗 EGFR 低分子抗体 Nanobody を分子標的素子として、微生物トランスグルタミナーゼ(MTG)による酵素的ペプチド連結を利用することでカチオンペプチドとの融合低分子抗体を作製し、細胞特異的 siRNA 運搬を行った．その結果、大腸菌を宿主として可溶性画分に発現させることに成功した。反応効率は 83%と算出され，難発現な R9 ペプチドをもつ Nanobody を高効率で作製できた． 共焦点顕微鏡により、Cy5 ラベルした siRNA と作製した抗体により A431 細胞への特異的送達を調べたところ、細胞内部に傾向が観察されたため、送達できていることが判明した。最後に A431 細胞を用いてモデルとして GAPDH のサイレンシングを行った。Nanobody-R9／siRNA を作用させたのち GAPDH 抗体で A431 細胞内の GAPDH 発現量を調べたところコントロールに比較して 35.4%の発現抑制を示した.

A fusion protein comprising an antibody and a cell-penetrating peptide is a candidate molecule capable of efficient and cell-specific delivery of siRNA into cells in order to reduce the side effects of nucleic acid drugs. However, their expression in bacterial hosts, required for their development, often fails, impeding research progress. In this study, we separately prepared anti-EGFR nanobodies with the K-tag sequence MRHKGS at the C-terminus and arginine-9 (R9) with the Q-tag sequence LLQGS at the N-terminus, and enzymatically ligated them in vitro by microbial transglutaminase to generate Nanobody-R9, which is not expressed as a fused protein in *E. coli*. Nanobody-R9 exhibited a maximum reaction efficiency of 85.1%, without changing the properties of the nanobody or R9. Nanobody-R9 successfully delivered siRNA into the cells, and the cellular influx of siRNA increased with increase in the ratio of Nanobody-R9 to siRNA. We further demonstrated that the Nanobody-R9–siRNA complex, at a 30:1 ratio, induced RNAi of target mRNA with approximately 52% efficiency compared to lipofectamine.

Cell-specific delivery, Transglutaminase, RNAi

講演番号：3I01-12
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:00～ ミーティングルーム I

Novel cDNA display platform for activity-based selection in protein engineering

○Jasmina DAMNJANOVIC[1], Nana ODAKE[1], Takaaki KOJIMA[1], Naoto NEMOTO[2], Hideo NAKANO[1] ([1]Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University, [2]Graduate School of Science and Engineering, Saitama University)

cDNA display is a well-established *in vitro* display technology used for the affinity-based selection of peptides and antibody fragments in protein engineering[1,2]. Advantages such as library size of up to 10^{14}, a stable link between genotype and phenotype, and absence of transformation or use of cells make cDNA display a very attractive technology for rapid screening of large libraries in protein engineering. Furthermore, increasing availability of next-generation sequencing (NGS) makes the library screening even more high-throughput and information-driven, since we can monitor the sequence enrichment and focus the engineering efforts on fewer positions shown to be highly impacting on the desired property.

In this study, we aimed at developing a cDNA display platform for the enzymatic activity-based selection of proteins and peptide variants. This has not been attempted so far although cDNA display technology has been mainly used for the selection of proteins and peptides based on binding activity. The workflow is as follows: generation of DNA library, selection of proteins/peptides by cDNA display based on enzymatic activity, analysis of the enriched DNA pool by NGS, bioinformatics analysis of the data. Our first target is a transglutaminase (TGase) reaction, a useful tool for protein modification and cross-linking in a wide range of fields including medical diagnostics, meat processing, etc. A mouse TGase2 and its known substrate, a short peptide named T26, has been targeted to establish the TGase substrate screening system. To ensure an efficient and controllable display formation, we introduced an *E.coli*-based cell-free protein synthesis system made of purified translation components, the PURE system. We have also demonstrated that short peptides such as T26 can be displayed without any protein tag even more efficiently, likely because the display format keeps the peptides soluble. After the establishment of the conditions for display formation and selection, we confirmed the enrichment of the original T26 sequence from binary model libraries consisting of the original T26 sequence and Q2A T26 mutant (negative control (NC); not a substrate of TGase). In the following, we performed the selection of a semi-random T26 library where 4 residues nearest to the reactive Gln (-1, 1, 2, 3) were randomized by the introduction of the NNK codon. Enriched DNA is now being analyzed by NGS. The novel *in vitro* selection system can be applied for rapid screening of TGase substrate preference, and in the future, for engineering various enzymes by directed evolution.

References: 1) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2018) 503: 2054; 2) *ACS Omega* (2019) 4: 7378.

mRNA/cDNA display, protein engineering, transglutaminase

発表責任者：DAMNJANOVIC Jasmina（damnjanovic.jasmina@b.mbox.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：3I01-13
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:00～ ミーティングルーム I

正常細胞に作用しない癌細胞選択的プロドラッグ酵素 TEM-1 変異体の開発

Engineering Escherichia coli ß-lactamase TEM-1 variants more active under acidic conditions than at the neutral pH

○高橋 美穂子、坂本 健作（国立研究開発法人理化学研究所）
○Mihoko TAKAHASHI, Kensaku SAKAMOTO (RIKEN)

がん治療において正常な細胞とがん細胞を区別することは重要であり、そのことで副作用を抑える試みが行われている。一つの方法として、安全な化合物を体内に投与し、がん細胞周辺に局在させた酵素によって、その場で抗がん剤などの毒性薬物へ変換するアプローチ（ADEPT 又はプロドラッグ治療）が提案されている。この方法では、がん細胞周辺のみ抗がん剤を高濃度に分布させることができ、生成した薬剤が腫瘍に浸透することも期待できる。本研究では安全性をさらに高めるために、本システムに用いられることの多い大腸菌 β-ラクタマーゼ TEM-1 の改変を試みた。がん細胞周辺は活発な糖代謝によって酸性環境になっていることが知られている。野生型 TEM-1 は酸性、中性で活性がほとんど変化しないが、仮に中性での活性が抑えられ、酸性での活性が高い TEM-1 変異体が得られれば、酵素ががん組織に局在する以前に体内を還流している間に、プロドラッグと出会って毒性薬剤に変換する危険を減らすことができる。ランダム変異の導入によって 1000 種類以上の変異体を作製してスクリーニングを実施した。この結果、160 位の Thr が Ile に変異した変異体 TEM-1(T160I)が中性よりも酸性で活性が高くなっていることを見出した。TEM-1 の結晶構造を参考に、160 位周辺に存在する 9 つのアミノ酸をすべて他のアミノ酸に置換して活性を調べたところ 162 番目の Leu が Glu に変わった変異体 TEM-1(L162E)についても、酸性下でより高い活性を示した。

参考文献：M. Takahashi *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2018) Vol.505, pp. 333-337.

特許出願番号：2018-164552

Escherichia coli β-lactamase TEM-1 is potentially useful in the prodrug therapy, for catalyzing the conversion of nontoxic prodrugs to toxic chemicals. The produced toxin would kill cancer cells, when the enzyme is attached to an antibody targeting cancerous antigen. In this plot, the occurrence of this toxic reaction in the blood or normal tissues raises a safety concern. We attempted to engineer TEM-1 variants with a preference for acidic pH. More than a thousand of TEM-1 variants with random mutations were screened in *E. coli* cells for the ability of conferring an antibiotic resistance preferentially in acidic growth media. A variant with a Thr-to-Ile substitution at position 160 or TEM-1(T160I) was thus isolated. An extensive mutagenesis study was conducted in the proximity of this position, which is distant from the catalytic site; it was found that an L162E mutation also caused the desirable preference for the acidic environment.

cancer cell, ADEPT, beta-lactamase

発表責任者：坂本健作（kensaku.sakamoto@riken.jp）

講演番号：3I01-14
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:00～ ミーティングルーム I

合理的変異導入法を用いる *Xenorhabdus doucetiae* 由来 2-オキソグルタル酸依存型 L-ピペコリン酸水酸化酵素の可溶性発現の改善

Improvement of 2-oxoglutarate-dependent L-pipecolic acid hydroxylase from *Xenorhabdus doucetiae* using rational mutagenesis

○板倉 葵[1]、篠田 優[1]、佐々野 晴花[2]、三宅 良磨[2]、川端 潤[2,3]、浅野 泰久[1]（[1]富山県大・生工研セ、[2]三菱ケミカル（株）、[3]（株）エーピーアイコーポレーション）
○ Aoi ITAKURA[1], Suguru SHINODA[1], Haruka SASANO[2], Ryoma MIYAKE[2], Hiroshi KAWABATA[2,3], Yasuhisa ASANO[1] ([1]Toyama Pref. Univ., [2]Mitsubishi Chemical Co., [3]API Co.)

【目的】異種発現系を用いた組換えタンパク質の生産は、産業上有用なタンパク質を安価で大量に生産するための重要な技術である。しかし、発現したタンパク質が封入体を形成し、不溶化・不活性化する問題があり、それらの解決は現在も重要な課題である。これまでに当研究室では、大腸菌を宿主とした際に不溶性発現するタンパク質に対して、不溶化に関与するアミノ酸残基（ホットスポット）を予測する方法である「α-helix rule」と「Hydropathy contradiction rule」を開発し、それらが可溶性発現の改善に有用であることを示してきた[1)]。本研究で対象とする *Xenorhabdus doucetiae* 由来 2-オキソグルタル酸依存型 L-ピペコリン酸水酸化酵素[2)]（XdPH）は、L-ピペコリン酸からシス-5-ヒドロキシ-L-ピペコリン酸を生成する産業上有用な酵素であるが、大腸菌で不溶性発現することが問題となっていた。そこで本研究では、当研究室で開発したホットスポット予測法を用いて XdPH に合理的な変異を導入し、可溶性発現の改善を行った。
【方法・結果】本研究では、XdPH の一次構造を基に「α-helix rule」と「Hydropathy contradiction rule」を用いてホットスポットを予測し、部位特異的に変異を導入した遺伝子を作製し、大腸菌を宿主として発現を行った。発現した各変異体は SDS-PAGE 並びに酵素活性測定により可溶性発現の評価を行った。その結果、野生型と比較して可溶性発現量が向上した変異体を効率よく得た。さらにそれらの変異を組合せた変異体も作製し、同様に可溶性発現の評価を行ったところ、単一変異体よりも可溶性発現量が大幅に向上した変異体を得ることができた。

1) D. Matsui and S. Nakano, *et al., Sci. Rep.*, **7**, 9558-9569 (2017).
2) 三宅良磨, 出来島康方 PCT/JP2015/080960 (特願 2014-229685).

The production of recombinant proteins in *Escherichia coli* as a host is inexpensive, fast, and high yielding. However, proteins often fail to fold and form aggregates (inclusion body). Our group found two rules, “α-helix rule” and “hydropathy contradiction rule”, to predict residues which make protein folding easier (aggregation hotspots) from the results of directed evolution and primary structure analysis[1)]. 2-oxoglutarate-dependent L-pipecolic acid hydroxylase[2)] from *Xenorhabdus doucetiae* (XdPH) is an industrially useful enzyme that produces cis-5-hydroxy-L-pipecolic acid from L-pipecolic acid. However, insoluble expression in *Escherichia coli* has been a problem. In this study, we introduced a rational mutation into XdPH using the hotspot prediction method developed in our laboratory to improve the soluble expression.

L-pipecolic acid hydroxylase, aggregation, rational design

講演番号：3I03-01
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:00～ ミーティングルーム I

タンパク質チロシン残基ニトロ化修飾の消去酵素 denitrase の探索と解析

Screening and analysis of protein 3-nitrotyrosine denitrase

○那須野 亮、高木 博史（奈良先端大・バイオ）
○Ryo NASUNO, Hiroshi TAKAGI (NAIST)

【背景と目的】一酸化窒素（NO）は様々な生物種において多様な生命現象に関わるシグナル分子である。NO によるシグナル伝達機構としてタンパク質の翻訳後修飾がある。NO 依存的な翻訳後修飾の一つであるタンパク質チロシン残基のニトロ化（Protein Tyrosine Nitration; PTN）は、チロシン残基フェノール性水酸基の p*K*a の低下やニトロ基の導入による立体障害、チロシン残基上におけるリン酸化修飾との競合などにより、タンパク質機能を制御することが報告されている。PTN は化学的に安定であるため、その消去（脱ニトロ化）には酵素反応による触媒が必要と考えられており、実際、哺乳類などから脱ニトロ化酵素（denitrase）活性が検出されている。これまで主に、基質タンパク質のニトロ化レベルの減少を指標に、denitrase の探索が行われているが、未だに同定されていない。本研究では、我々がこれまでに NO 研究の対象としてきた酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を用い、低分子基質を用いた新たな方法論により denitrase を探索し、これを同定することを目的とした。
【結果と考察】一部のタンパク質脱リン酸化酵素は、修飾部位に相当する遊離リン酸化アミノ酸に対しても活性を示す。そこで、denitrase も PTN 修飾部位に相当する遊離 3-ニトロチロシン（3NT）に対して活性を示すと仮説を立て、酵母の細胞抽出液と遊離 3NT との反応液からチロシン生成の検出を試みた。その結果、遊離 3NT およびタンパク質依存的にチロシンの合成が検出され、細胞抽出液に遊離 3NT denitrase 活性が存在することを見出した。続いて、3NT を共有結合させた樹脂を作製し、細胞抽出液から 3NT 結合タンパク質を探索した。溶出画分を SDS-PAGE で分離し、質量分析に供した結果、3NT 結合タンパク質として酸化還元酵素を含む 11 種類のタンパク質を同定した。現在、各タンパク質の遺伝子破壊が、遊離 3NT denitrase 活性や細胞内 PTN レベルに及ぼす影響を解析している。

Nitric oxide (NO) is a ubiquitous signaling molecule involved in a variety of physiological events. Protein tyrosine nitration (PTN) is one of NO-mediated post-translational modifications and regulates protein functions. PTN should to be denitrated by enzymatic reactions due to its chemical stability. So far, the denitrase activities have been detected in several organisms, however the responsible enzymes have not yet been identified. Here, we tried to search denitrase by focusing on its activity against free 3-nitrotyrosine (3NT), which corresponds to the modified residues in PTN. We detected the free 3NT denitrase activity in cell-free extract from *Saccharomyces cerevisiae*. Using the 3NT-conjugated beads, 11 proteins were identified as the free 3NT-binding protein including oxidoreductases. Now, we further analyze these 3NT-binding proteins in terms of the free 3NT denitrase activity.

protein tyrosine nitration, denitrase, nitric oxide

発表責任者：那須野　亮（r-nasuno@bs.naist.jp）

講演番号：3I03-02
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:00～ ミーティングルーム I

核内エキソソームの分解ターゲットとなる polyA+RNA の解析

The analysis of polyA+RNA targeted for degradation of nuclear exosome

○杉元 啓悟[1]、藤原 奈央子[1]、瀬尾 茂人[2]、増田 誠司[1] ([1]京都大学、[2]大阪大学)
○KEIGO SUGIMOTO[1], NAOKO FUJIWARA[1], SHIGETO SENO[2], SEIJI MASUDA[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Osaka Univ.)

エキソソソームは、真核生物において 3’-5’から RNA を分解する活性を持つ複合体であり、様々な転写物の適切なトリミングと完全な分解の両方に機能している。9 つの成分からなるリング状のコアは細胞質と核の両方に存在するが、触媒的に不活性である。様々な細胞内基質に対応するため、細胞内コンパートメント特異的なヌクレアーゼや補因子がこのコアに結合している。私たちは以前、核内特異的エキソソームの阻害により、polyA$^+$RNA が顕著に核内に蓄積することをヒト細胞で発見した。polyA$^+$RNA の核内蓄積は、いくつかのエキソソーム補因子の単独または複数阻害によっても誘導される。この発見に着想を得て、エキソソソーム阻害によって安定化した核内 polyA$^+$RNA を解析し、各補因子に対する感受性に基づいていくつかのカテゴリーに分類した。その結果、それぞれのカテゴリーに含まれる polyA$^+$ 基質は、遺伝子型、遺伝子長、アデニル化機構などの点で異なる特徴を持っていることが明らかになった。この結果は、基質の特徴が各補因子に対する感度を大きく左右し、プロセシングを受けるか完全に消去されるかといった運命に影響していることを示唆している。

The exosome is a large multimeric complex majorly responsible for the 3’-5’ exoribonucleolytic activity in eukaryotes, functioning in both the processing and the complete decay of various transcripts. The ring-shaped core consisting of 9 components is catalytically inert and exists both in the cytoplasm and the nucleus. The core is accompanied with the subcellular compartment-specific nucleases as well as the subcellular compartment-specific cofactors to deal with a variety of substrates. We previously found that the inhibition of the nuclear specific exosome results in the robust nucleoplasmic accumulation of polyA$^+$ RNAs in human cells. This nucleoplasmic polyA$^+$ RNA accumulating phenotype is also induced by the depletion of several exosome cofactors solely or simultaneously. These data prompted us to dissect the nuclear polyA$^+$ RNAs stabilized upon the exosome inhibition to be sorted into several categories based on their sensitivity to each cofactor. This analysis indicated that the polyA$^+$ substrates within each category harbors distinct features from other categories, such as for their gene-biotypes, gene lengths and adenylation mechanisms. Our data suggests that the substrate features substantially determines the sensitivity to each cofactor thus affects their fate, such as to be processed or to be completely erased.

exosome, polyA+RNA

発表責任者：杉元啓悟（gitchon777do@gmail.com）

講演番号：3I03-03
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:00～ ミーティングルーム I

ハロアルカンデハロゲナーゼ及びデアミナーゼからなる融合酵素 DahX の tRNA 編集活性

tRNA editing activity of fusion enzyme DahX consisting of haloalkane dehalogenase and deaminase

○高橋 由紀子、佐藤 優花里、中鉢 千尋、野々山 翔太、永田 裕二（東北大院）
○Yukiko Takahashi, Yukari Sato, Chihiro Chubachi, Shota Nonoyama, Yuji Nagata (Tohoku Univ.)

PCB 分解細菌 *Acidovorax* sp. KKS102 株の融合タンパク質 DahX の N 末端領域 (1-153 a.a.) は tRNA 特異的アデノシンデアミナーゼ、C 末端領域 (165-463 a.a.) はハロアルカンデハロゲナーゼ (HLD) と相同性を示す。当研究室は DahX と DahX(165-463)が HLD 活性を有することを明らかにした (中鉢、日本農芸化学会 2018 年度大会)。本研究は、DahX が $tRNA_{Arg}$ の 34 位のアデニンをイノシンに編集する tRNA 編集活性を有するか検証することを目的とした。

DahX、DahX(1-168)及び tRNA 編集活性の触媒残基と予想された 57 番目のグルタミン酸をアラニンに置換した DahX(E57A)の C 末端に His-tag を付与したタンパク質を大腸菌内で大量発現させ、Ni アフィニティーカラムを用いて精製した。*in vitro* 転写系で合成した $tRNA^{Arg}$ と精製した DahX、DahX(1-168)、DahX(E57A)をそれぞれ反応させ、反応産物から合成した cDNA の塩基配列をサンガー法により決定した。本実験系では tRNA 編集活性により 34 位のアデニンがイノシンへ編集されるとグアニンとして読まれる。0.39 pmol の DahX を加えると 34 位のアデニンは 100%グアニンとして読まれた。一方、DahX(1-168)及び DahX(E57A)を 7.8 pmol 加えてもグアニンとして読まれる割合はそれぞれ 65.9%及び 0%だった。これらの結果は、DahX が tRNA 編集活性を有すること、および本活性に HLD 領域も関与することを示している。

Acidovorax sp. strain KKS102 has a fusion protein DahX, whose N-terminal (aa 1-153) and C-terminal (aa 165-463) regions are homologous to tRNA-specific adenosine deaminase (EC 3.5.4.33) and haloalkane dehalogenases (EC 3.8.1.5) (HLDs), respectively. We previously reported that DahX and DahX(165-463) possess HLD activity. Here we examined the tRNA editing activity of DahX, DahX(1-168), and DahX(E57A), whose putative catalytic residue E57 was changed to A. These proteins were His-tagged, expressed in *E. coli*, and purified using Ni affinity column. The $tRNA^{Arg}$ synthesized *in vitro* was incubated with the purified proteins, converted to cDNA by RT-PCR, and sequenced. If adenine (A) is edited to inosine (I) by the deaminase, the A position is sequenced as guanine (G). Adenine at position 34 of $tRNA^{Arg}$ incubated with DahX was sequenced as G. On the other hand, this A-to-G change was not detected at all and partially detected when $tRNA^{Arg}$ was incubated with DahX(E57A) and DahX(1-168), respectively. These results indicate that (i) DahX has the tRNA editing activity and (ii) E57 is responsible for the editing activity and (iii) the HLD region also contributes to the editing activity.

tRNA editing, dehalogenase, deaminase

講演番号：3I03-04
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:00～ ミーティングルーム I

γセクレターゼ変異体の解析に向けた酵母発現・精製系の構築

Construction of expression and purification system in yeast for analysis of γ-secretase mutant

○関 正義、小川 智久、日高 將文、二井 勇人（東北大院農）
○Masayoshi SEKI, Tomohisa OGAWA, Masafumi HIDAKA, Eugene FUTAI (Tohoku Univ.)

【目的】γ セクレターゼは、4 つのサブユニット NCT、PS1、Aph1、Pen2 から構成されるプロテアーゼであり、アルツハイマー病患者の脳に蓄積するアミロイド β（Aβ、37～43 アミノ酸残基）の生成に関わっている。長鎖 Aβ は凝集しやすく、この疾病の発症原因のひとつと考えられている。我々は酵母を用いたスクリーニングにより長鎖 Aβ の生成を抑える変異を PS1 に多数同定している[1)]。本研究ではそれらの変異のひとつである PS1 L432M/C158Y 二重変異の導入により、なぜ Aβ 生成が変化するのかを構造生物学的に解明することを目指し、γ セクレターゼ変異体の大量発現・精製系を構築した。
【方法】双方向 GAL promoter を用いた発現コンストラクト（pBEVY-G)を作製し、出芽酵母に導入した。ガラクトース添加による発現誘導後、ガラスビーズ法で破砕し、遠心分離により膜画分を取得した。膜画分を CHAPSO もしくは n-Dodecyl-β-D-maltoside で可溶化し、Pen2 に付加した FLAG タグに結合する FLAG 抗アフィニティーゲルを用いた精製を行った。
【結果・考察】ガラクトース誘導による発現と可溶化条件を最適化し、アフィニティー精製に成功した。精製画分中のサブユニット組成を immunoblotting で確認した結果、PS1 L432M/C158Y 二重変異を導入した γ セクレターゼ変異体では、野生型に比べて NCT 量が低下していた。変異により NCT と他のサブユニット間での相互作用が低下していることが示唆された。

γ-secretase is an intramembrane protease composed of four subunits, NCT, PS1, Aph1 and Pen2, and produces amyloid β (Aβ) with 37-43 amino acid residues. Long Aβ species are prone to form amyloids and recognized as the causes of Alzheimer's disease. Using yeast reconstitution system, we identified several mutations in PS1, which suppress long Aβs[1)]. PS1 L432M / C158Y mutation is one of these mutations. The aim of this study is to reveal structural feature of the mutant and clarify the molecular mechanism of Aβ production. We generated pBEVY-G plasmids containing γ-secretase subunits for expression under GAL promoter, and introduced them into yeast. After induction by adding galactose in the media, total membrane fraction was prepared and solubilized with CHAPSO or n-Dodecyl-β-D-maltoside. γ-secretase complex was purified using a FLAG affinity gel, which binds to FLAG tag on Pen2. When we analyzed subunit composition of the purified γ-secretase complex by immunoblotting, the amount of NCT was greatly reduced in the mutant compared with the WT, suggesting that the double mutation in PS1 reduced interaction between NCT and other three subunits.

1) Futai et al., *J. Biol. Chem.*,291.435-446 (2016).

alzheimer, γ-secretase, protease

発表責任者：関 正義（masayoshi.seki.t5@dc.tohoku.ac.jp）

講演番号：3I03-05
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:00～ ミーティングルーム I

酵母を用いたスクリーニングによるγセクレターゼサブユニット Aph1 の機能解析

Functional analysis of γ-secretase subunit Aph1 in the yeast reconstitution system

○渡辺 ひかり[1]、吉田 知加[1]、蔡 哲夫[2]、日高 將文[1]、小川 智久[1]、富田 泰輔[2]、二井 勇人[1]([1]東北大院農、[2]東大院薬)

○Hikari Watanabe[1], Chika Yoshida[1], Tetsuo Sai[2], Masafumi Hidaka[1], Tomohisa Ogawa[1], Taisuke Tomita[2], Eugene Futai[1] ([1]Graduate School of Agricultural Sciences, Tohoku University, [2]Graduate School of Pharmaceutical Sciences, the University of Tokyo)

アルツハイマー病（AD）の原因物質として考えられているアミロイドβ（Aβ）は、アミロイド前駆体タンパク質（APP）をβおよびγセクレターゼが切断することで生成される。Aβの凝集性や細胞毒性は、Aβ40 と比べ Aβ42 で著しく高く、これら Aβ種の産生はγセクレターゼ活性に関係する。一方、γセクレターゼのサブユニットである Aph1 は、複合体の足場タンパク質と考えられてきたが、その機能の詳細は解明されていない。本研究では Aph1 がプロテアーゼ活性に与える影響を解析することを目的とした。
はじめに、Error-prone PCR により Aph1 遺伝子にランダムに変異を導入し、その他のサブユニットとともに酵母に形質転換した。酵母再構成系により切断活性をレポーター遺伝子発現から評価し、γ セクレターゼの活性を上昇させる活性化変異を同定することに成功した。続いて、レトロウイルスを用いて Aph1a/b/c 欠損マウス胚性線維芽（MEF）細胞に Aph1 変異体を導入し、培地中に分泌する Aβ を検出して哺乳類細胞中での機能と Aβ 生成量を解析した。Aph1 L30F/T164A 変異体（以下 LFTA）では複合体形成量には変化が見られない一方、APP の切断が亢進した。LFTA 変異体が生成する総 Aβ 量は野生型に比べて増加していた。この活性化変異の位置は触媒サブユニットであるプレセニリン（PS1）と近接していることから、Aph1 が PS1 に作用し、切断活性に影響を与えることが示唆された。Aph1 がγセクレターゼ調節薬の標的となりうる可能性を示す結果となった。

Amyloid-β (Aβ), causative substance of Alzheimer's disease (AD), is produced by the cleavage of amyloid precursor protein (APP) by β- and γ-secretases. Aggregation properties and cytotoxicities of Aβ peptides are significantly higher at Aβ42 than Aβ40, of which cleaving types depend on the γ-secretase. The γ-secretase is a multi-subunit protease complex composed of catalytic subunit presenilin-1 (PS1) and the regulatory subunits nicastrin and PEN-2, in addition to Aph1. Although Aph1 has been considered as a scaffolding protein of the γ-secretase complex, its function is not clear. To elucidate the function of Aph1, in this study, we analyze the effect of Aph1 on protease activity of γ-secretase by mutant analyses. First, we randomly introduced mutations into the Aph1 gene by Error-prone PCR and transformed it into yeast. Cleavage activities of mutants were assessed by the yeast reporter gene expression, resulting in activating mutations increasing γ-secretase activity such as Aph1 L30F/T164A(LFTA). Subsequently, we introduced Aph1 mutants into Aph1a/b/c KO mouse embryonic fibroblast (MEF) cells and analyzed their function including Aβ products. It was found that the total amount of Aβ produced by LFTA mutant was increased compared to the wild type without quantitative variation of protease complexes. These results suggest that Aph1 affects on the catalytic subunit PS1 and its cleavage activity. This indicates that Aph1 is a potential target for γ-secretase modulators.

γ-secretase, Amyloid, Alzheimer's disease

発表責任者：渡辺ひかり（hikari.watanabe.q6@dc.tohoku.ac.jp）

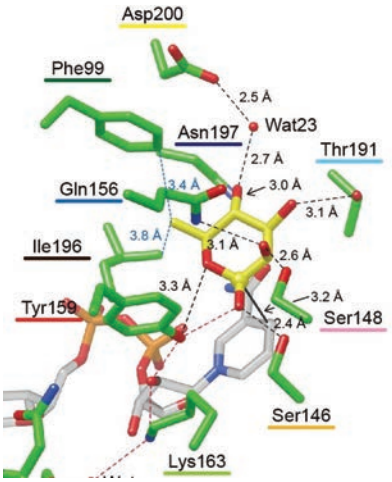
講演番号：3I03-06
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:00～ ミーティングルーム I

細菌由来 L-ラムノース 1-脱水素酵素の X 線結晶構造解析

Crystal structure of L-rhamnose 1-dehydrogenase from bacteria

○吉原 健太郎[1]、渡辺 誠也[1,2]、渡邊 康紀[1,3] ([1]愛媛大農、[2]愛媛大沿岸環境科研セ、[3]山形大理)
○Kentaro YOSHIWARA[1], Seiya WATANABE[1,2], Yasunori WATANABE[1,3] ([1]Ehime Univ., [2]Ehime Univ. CMES, [3]Yamagata Univ.)

【背景・目的】窒素固定細菌 *Azotobacter vinelandii* 由来の L-ラムノース 1-脱水素酵素(AvLRA1)は、リン酸化を伴わないユニークな L-ラムノース代謝経路の初発の反応において、L-ラムノースの L-ラムノノ-γ-ラクトンへの酸化を触媒する（Watanabe *et. al, J. Biol. Chem.* 2008, 283, 20372-20382）。本酵素の属する Short-chain dehydrogenase/reductase (SDR)タンパク質ファミリーには、生理学的役割が不明なアルドース脱水素酵素がいくつか含まれているが、これらの間で相同性は低く基質特異性も全く異なっている。そこで本研究では、立体構造を決定することによって AvLRA1 の基質や補酵素特異性、および触媒メカニズムを明らかにすることを目的とした。【方法・結果】分子置換法により、AvLRA1 のアポ型、NAD^+結合型、$NADP^+$結合型、NAD^+および L-ラムノース結合型の構造をそれぞれ決定した。L-ラムノースは、Phe99、Ser146、Ser148、Gln156、Tyr159、Thr191、Ile196、Asn197、Asp200 のアミノ酸残基と相互作用していた。これに基づく部位特異的変異体の解析から、Gln156 は触媒機構そのものに、Phe99 と Ile196 は 6 位のメチル基との疎水性相互作用で基質特異性に重要なことが明らかとなった。$NADP^+$の 2'-リン酸基は Ser14、Arg15、Ser37 により認識されていたのに対し、NAD^+の 2'-水酸基に相互作用は存在しておらず、これは本酵素の補酵素特異性をよく説明できた。



L-Rhamnose 1-dehydrogenase from *Azotobacter vinelandii* catalyzes the oxidization of L-rhamnose to L-rhamnono-γ-lactone in non-phosphorylative pathway of L-rhamnose metabolism, and belongs to the short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) superfamily. To elucidate the unique substrate and coenzyme specificities at the atomic level, we determined the crystal structures of AvLRA1 in the ligand-free, NAD^+-bound, $NADP^+$-bound, and L-rhamnose- and NAD^+-bound forms. L-Rhamnose interacted with Phe99, Ser146, Ser148, Gln156, Tyr159, Thr191, Ile196, Asn197, and Asp200. Site-directed mutagenic analysis, based on these structural insights, revealed that among them, Gln156 is absolutely important for the catalysis, and Phe99 and Ile196 significantly recognize the C6 methyl group of L-rhamnose through hydrophobic contact. The 2'-phosphate group of $NADP^+$ interacted with Ser14, Arg1, Ser37, whereas there was no interaction with the 2'-hydroxyl group of NAD^+, conforming to the preference of $NADP^+$ over NAD^+.

L-Rhamnose metabolism, L-Rhamnose 1-dehydrogenase, Short-chain dehydrogenase/reductase

講演番号：3I03-07
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:00～ ミーティングルーム I

病原性細菌由来 Dipeptidyl peptidase の基質 P2 残基の嗜好性と認識機構の分子基盤

Preference and molecular basis of substrate recognition at the P2 residues in the Dipeptidyl peptidase from pathogens

○中村 彰宏[1]、阪本 泰光[2]、鈴木 義之[3]、六本木 沙織[4]、志田 洋介[1]、田中 信忠[5,6]、小笠原 渉[1]([1]長岡技科大・工、[2]岩手医大・薬、[3]長岡高専、[4]岩手医大・医、[5]昭和大・薬、[6]北里大・薬)
○Akihiro NAKAMURA[1], Yasumitsu SAKAMOTO[2], Yoshiyuki SUZUKI[3], Saori ROPPONGI[4], Yosuke SHIDA[1], Nobutada TANAKA[5,6], Wataru OGASAWARA[1] ([1]Sch. of engr., Nagaoka Univ. of Tech., [2]Sch. of pharm., Iwate Med. Univ., [3]NIT, Nagaoka College, [4]Sch. of med., Iwate Med. Univ., [5]Sch. of pharm., Showa Univ., [6]Sch. of pharm., Kitasato Univ.)

2050 年には多剤耐性菌による感染症の死者が、がんによる死者を超えると予想されている。細菌由来 Dipeptidyl peptidase (DPP) 7 と DPP11 は Family-S46 ペプチダーゼ(以後 S46 ペプチダーゼ)に属し、タンパク質を栄養源とする一部の糖非発酵性グラム陰性細菌 (NF-GNB)の生育に重要なペプチダーゼである。DPP7 と DPP11 は哺乳類には存在しないため、S46 ペプチダーゼは抗菌薬の標的分子として期待されている。これまでに基質 P1 残基認識機構は分子レベルでの解析が進んでいる一方で、基質 P2 残基の認識機構は未解明である。

本研究では敗血症の死亡率が 7 割に達する多剤耐性日和見感染菌 *Stenotrophomonas maltophilia* (Sm 菌)由来 DPP7 (SmDPP7)の基質 P2 残基認識機構を解明した。生成物であるジペプチドを用いた競合阻害試験は SmDPP7 の基質 P2 残基の疎水性アミノ酸と例外的な親水性アミノ酸のアスパラギン(Asn)への特異性を示した。SmDPP7 と Asn-Tyr ジペプチドの共結晶構造解析および等温滴定型カロリーメトリによる結合熱の解析は、基質 P2-Asn の特異性は S2 サブサイトにおける水素結合ネットワークに起因することを明らかにした。この疎水性残基および Asn への基質特異性は他の病原性 NF-GNB 由来の DPP7 および DPP11 においても保存されていたため、本研究成果は DPP7 および DPP11 の両酵素群を阻害する S46 ペプチダーゼのユニバーサルインヒビターの開発に寄与する。

The emergence of drug-resistant bacteria has become a major problem worldwide. Bacterial dipeptidyl peptidases 7 and 11 (DPP7s and DPP11s), belonging to the family-S46 peptidases, are important enzymes for bacterial growth and are not present in mammals. Therefore, specific inhibitors for these peptidases are promising as potential antibiotics. While the molecular mechanisms underlining strict substrate specificity at the S1 subsite of S46 peptidases have been well studied, those of relatively broad substrate preference at the S2 subsite of these peptidases are unknown. In this study, we performed structural and biochemical analyses on DPP7 from *Stenotrophomonas maltophilia* (SmDPP7). SmDPP7 showed substrate preference for hydrophobic amino acids at the S2 subsite in general, but as an exception, also for asparagine, a hydrophilic amino acid. Structural analyses of SmDPP7 revealed that this exceptional preference to asparagine is caused by a hydrogen bonding network at the bottom of the S2 subsite. The residues in the S2 subsite are well conserved among S46 peptidases as compared with those in the S1 subsite. We expect that our findings will contribute toward the development of a universal inhibitor of S46 peptidases.

Substrate recognition, Peptidase, Pathogens

発表責任者：小笠原渉（owataru@vos.nagaokaut.ac.jp）

講演番号：3I03-08
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:00～ ミーティングルーム I

Grimontia hollisae コラゲナーゼの活性部位のヒスチジン残基とチロシン残基の役割
The roles of histidine and tyrosine residues in the active site of collagenase in *Grimontia hollisae*
○池内 健晃[1]、林 魁一[1]、滝田 禎亮[1]、森下 諒[1]、銭 鈞[1]、兒島 憲二[1]、田中 啓友[2]、服部 俊治[2]、保川 清[1] ([1]京大院農、[2]株式会社ニッピバイオマトリクス研究所)
○Takeaki Ikeuchi[1], Kaichi Hayashi[1], Teisuke Takita[1], Ryou Morisita[1], Jun Qian[1], Kenji Kojima[1], Keisuke Tanaka[2], Shunji Hattori[2], Kiyoshi Yasukawa[1] ([1]Grad. Sch. of Agric., Kyoto Univ., [2]Nippi Research Institute of Biomatrix)

【目的】*Grimontia*（*Vibrio*）*hollisae* 1706B のコラゲナーゼ（Ghcol）は、高い活性と安定性を有し、細胞分散剤として使用されており、さらなる用途拡大が期待されている[1)]。本酵素は亜鉛結合モチーフ $H^{492}EYVH^{496}$ をもつ。我々は活性の pH、温度依存性から酸性側の活性解離基は Glu493 と推定した。一方、塩基性側は His または Tyr と考えられたが不明であった[2)]。本研究では活性部位近傍に存在すると予想される His、Tyr 残基の変異体を 9 種類作製し、活性を調べることで触媒機構の解明を試みた。
【方法と結果】1. 酵素の調製：野生型酵素（WT）と変異体を *Brevibacillus* で発現させた。WT と 6 種（H412A、H485A、H492A、H496A、H578A、H737A）は培養上清から硫安分画と陰イオン交換クロマトにより精製酵素が得られたが、H426A、Y497A、Y568A は得られなかった。２．活性測定：上記 6 種中、H412A、H485A、H578A、H737A は FITC 標識 I 型コラーゲンを分解したが、H492A、H496A はしなかった。H412A、H578A、H737A は MOCAcKPLGL(Dpa)AR を分解したが、H485A、H492A、H496A はしなかった。
【考察】H426A、Y497A、Y568A が調製されなかったことから、H426、Y497、Y568 はタンパク質の安定性に重要と示唆された。活性測定の結果とクロストリジウム属コラゲナーゼの結晶構造との比較から、Y568 が塩基性側活性解離基である可能性が示唆された。現在 Ghcol の結晶化に取り組んでいる。
【文献】 1. N. Teramura, K. Tanaka et al. (2010) J. Bacteriol. 193, 3049-3056
2. T. Takita, J. Qian et al. (2018) J. Biochem. 163, 425-431

[Purpose] Collagenase from the *Grimontia hollisae* strain 1706B (Ghcol) is a highly active zinc metalloproteinase with the zinc-binding motif $H^{492}EXXH^{496}$ [1)]. We previously examined the pH and temperature dependencies of Ghcol activity; Glu493 was thought to contribute acidic pK_a, while no residue was assigned to contribute alkaline pK_a [2)]. Here, we prepared nine single variants at the His or Tyr residues in and near the active site and characterized them.
[Methods and Results] 1. Ghcol preparation: Ghcols were expressed in *Brevibacillus*. The wild-type Ghcol and six variants (H412A, H485A, H492A, H496A, H578A, H737A) were purified from the supernatants, while H426A, Y497A, and Y568A were not. 2. Activity measurement: Of the six variants, H412A, H485A, H578A, and H737A cleaved type I collagen, while H492A and H496A did not. H412A, H578A, and H737A cleaved MOCAcKPLGL(Dpa)AR while H485A, H492A, and H496A did not.
[Discussion] H426, Y497, and Y568 were thought to be important for stability. Based on the results of activity measurement and the reported crystal structures of clostridial collagenases, Tyr568 of Ghcol is suggested to be the ionizable residue for alkaline pK_a.
[References] 1. N. Teramura, K. Tanaka et al. (2010) J. Bacteriol. 193, 3049-3056
2. T. Takita, J. Qian et al. (2018) J. Biochem. 163, 425-431

Collagenase, *Grimontia hollisae*, Collagen

講演番号：3I03-09
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:00～ ミーティングルームⅠ

D-アミノ酸アミド加水分解酵素の基質結合部位の充填がジペプチド合成に及ぼす影響

Space filling of substrate binding domain of D-amidohydrolase affects its dipeptide synthetic activity

○江良 祐一、有馬 二朗（鳥取大農）
○Yuichi ERA, Jiro ARIMA (Tottori Univ.)

【目的】*Streptomyces* sp. 82F2 由来 D 体特異的アミド加水分解酵素（DAH）は、活性中心に Ser を持ち、アミノリシス反応を触媒してペプチドを生成する。本酵素は D-アミノ酸に対し高い反応性を有することから、D-アミノ酸含有ペプチドの生産ツールとしての利用を検討している。DAH の活性部位となるポケットは基質認識や反応性に関わり、先行研究では活性部位ポケットの一部の空間を埋めた変異酵素 A267F DAH が 1,8-ジアミノオクタンを基質とした反応で大幅なアミノリシス活性の増加が確認された。また活性部位ポケットの別の空間を埋めた変異酵素 G271F DAH は、同反応で立体選択性の低下が見られた。そこで本研究では、上記２つの変異酵素のペプチド合成時の基質選択性とアミノリシスにおける反応性の詳細を検討した。
【結果】Phe-OMe 及び Trp をそれぞれ生成ジペプチドの前にくるアミノ酸、後ろに来るアミノ酸に設定し、それぞれの立体、Phe-OMe の N-アセチル化、Trp のエステル化によるアミノリシス活性への影響を、野生型酵素及び変異酵素それぞれで評価した。Ac-Phe-OMe と Trp を使用した反応では、A267F DAH のアミノリシス活性が優位に高い結果となった。一方で、Trp-OEt を基質として使用すると、アミノリシス生成物である D-Phe-L-Trp-OEt が多く生成され、このアミノリシス反応は野生型 DAH が最も高い結果となった。一方で、本実験において G271F は活性が殆んど確認されなかった。さらには、Phe-OMe と Trp-OEt を使用した反応において、ジケトピペラジンが生成物として確認された。

D-Stereospecific amidohydrolase from *Streptomyces* sp. 82F2 (DAH) catalyzes peptide synthesis through aminolysis in accordance with hydrolysis. Because DAH recognizes D-amino acids, the enzyme is expected to be utilized as a catalyst for functional D-peptide synthesis. DAH has a large pocket that plays functional roles in substrate recognition. Previous study demonstrated that, in the reaction using 1,8-diaminooctane as acyl acceptor, increase in aminolysis and change in stereoselectivity occurred by filling part of the pocket of DAH. In this study, we assessed the effect of fill of pocket of DAH on peptide synthesis by using WT, A267F, G271F DAHs.
In the reaction using Ac-Phe-OMe and Trp as substrate, A267F exhibited highest aminolysis activity. Meanwhile, the aminolysis by WT was significantly higher than other mutants in the reaction using Phe-OMe and Trp-OEt. Also, efficient dipeptide synthesis was observed when using Trp-OEt as acyl receptors with a new product diketopiperazine.

aminolysis, dipeptide, D-amino acid

発表責任者：有馬二朗（arima@tottori-u.ac.jp）

講演番号：3I03-10
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:00～ ミーティングルーム I

異化的金属還元菌 *Geobacter sulfurreducens* 由来ロダネーゼ様タンパク質 ExtH の基質特異性およびシステイン残基の役割の解析

Analysis of substrate specificity and role of cysteine residues in the rhodanese-like protein ExtH from the dissimilatory metal-reducing bacterium *Geobacter sulfurreducens*

○石戸 雄大、ムスト・イシュラット ジャハン、戸部 隆太、三原 久明（立命館大生命）
○Yudai Ishido, Mst. Ishrat Jahan, Ryuta Tobe, Hisaaki Mihara (Ritsumeikan Univ.)

ロダネーゼは、活性中心システイン残基を介してチオ硫酸の硫黄原子をシアン化物イオンに転移する反応を触媒する硫黄転移酵素である。ロダネーゼ様ドメインは生物種問わず広く分布するユビキタスなドメインであり、ロダネーゼ様タンパク質群は多様性に富んだファミリーを形成している。異化的金属還元菌 *Geobacter sulfurreducens* の ExtH は、2 つのロダネーゼ様ドメインを有する機能未知のリポタンパク質であり、近縁ホモログは同属細菌にのみ存在する。本研究では、ExtH の酵素学的諸性質および２つのロダネーゼ様ドメインに存在するシステイン残基の役割の解明を目的とした。

精製 ExtH のロダネーゼ活性の至適 pH は 8.0、至適温度は 65°C であった。基質特異性を調べた結果、硫黄ドナー基質として、チオ硫酸（k_{cat} = 24 s^{-1}、K_m = 6.2 mM）の他に、ポリスルフィド（k_{cat} = 19,000 s^{-1}、K_m = 0.2 mM）をはじめ、*p*-トルエンチオスルホン酸、メタンチオスルホン酸、グルタチオンペルスルフィド、3-メルカプトピルビン酸に活性が認められた。k_{cat}/K_m を算出した結果、ポリスルフィドが ExtH の最適な基質であることがわかった。ポリスルフィドとシアン化カリウムを基質とした場合の ExtH の硫黄転移活性の至適 pH は 9.0、至適温度は 60°C であった。ExtH はポリスルフィドを良い基質としながら、幅広い基質特異性を示す点で、新規なロダネーゼ様タンパク質であることがわかった。ExtH の 2 つのロダネーゼ様ドメインに存在するシステイン残基（Cys129、Cys330）を各々アラニンに置換した変異型酵素（C129A、C330A）を作製し、精製を行った。C129A はポリスルフィドおよびチオ硫酸に対して野生型とほぼ同程度の活性を保持していた。一方で、C330A の両基質に対する活性は著しく（野生型酵素の 1/650～1/690 に）低下していたことから、Cys330 が触媒機能に重要であることが明らかとなった。

Rhodanese is a ubiquitous enzyme catalyzing sulfur transfer from thiosulfate to cyanide. The *extH* gene in the genome of an iron-reducing bacterium, *Geobacter sulfurreducens*, encodes a putative rhodanese-like lipoprotein with low sequence homology to other known rhodaneses. Herein, we purified and characterized the recombinant ExtH to clarify its biochemical properties and the role of the conserved Cys residues located in the two independent rhodanese-like domains. Kinetic analysis showed that ExtH preferred polysulfide as a sulfur-donor substrate. The enzyme also utilized thiosulfate but with much less activity. The activity of the C330A toward polysulfide (or thiosulfate) was markedly decreased, while the C129A mutant enzyme showed an activity almost identical to that of the wild-type enzyme, suggesting that Cys330 is important for the catalysis.

Rhodanese, Sulfur transferase, *Geobacter sulfurreducens*

発表責任者：三原久明（mihara@fc.ritsumei.ac.jp）

講演番号：3I03-11
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:00～ ミーティングルームⅠ

白色腐朽担子菌 *Phanerochaete chrysosporium* 由来の Class 3 に属するシトクロム P450 CYP505D6 の機能解析

Characterization of self-sufficient cytochrome P450 CYP505D6 from white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*

○森 玲香、ワイズ 里沙、酒井 杏匠、志水 元亨、加藤 雅士 (名城大農)
○Reini MORI, Lisa WISE, Kiyota SAKAI, Motoyuki SHIMIZU, Masashi KATO (Meijo Univ.)

白色腐朽菌 *Phanerochaete chrysosporium* 由来のシトクロム P450（以下 P450）は様々な化合物を水酸化することが報告されている。*P. chrysosporium* のゲノムには、154 種の P450 遺伝子がコードされ、この中に Class 3 に属する P450/P450 レダクターゼ融合タンパク質遺伝子は 7 つ（CYP505D1 ~ CYP505D7）存在する。Class 3 P450 の機能については、細菌由来の BM-3 (CYP102A1) について詳細に研究され、飽和脂肪酸の ω-1 ~ ω-3 位を水酸化することが明らかになっている。本研究では、*P. chrysosporium* 由来の Class 3 に属する P450 の機能を解析した。*P. chrysosporium* の培養液中に脂肪酸であるラウリン酸を添加し、転写量が最も増加した CYP505D6（以下 D6）のリコンビナントタンパク質を調製した。D6 は各炭素鎖長 9 ~ 15 の脂肪酸・脂肪族アルコールの ω-1 ~ ω-6 位 (1-ドデカノールは ω-1 ~ ω-7 位) を水酸化したことから、広い位置選択性を有することが示された。D6 と BM-3 のアミノ酸配列を比較したところ、BM-3 において基質との結合に重要な役割を果たすアミノ酸のうち Y51 が D6 では V であった。さらに BM-3 の構造モデリング解析から、活性部位の入り口付近に存在している Y51 を V に置換すると活性部位の入り口が広くなることが推定された。そこで、D6 の V51Y 変異型酵素と BM-3 の Y51V 変異型酵素を調製し、それぞれラウリン酸と反応させたところ、D6 の V51Y 変異型酵素では野生型 D6 に比べて ω-4 ~ ω-6 位の水酸化脂肪酸が減少した。一方、BM-3 の Y51V 変異型酵素では野生型 BM-3 では生成されなかった ω-4 ~ ω-7 位の水酸化脂肪酸が新たに生成された。以上の結果より、D6 の広い位置選択性と基質特異性には V51 が重要であることを証明した。[1] 現在、CYP505D4 の機能について検討している。

The activity of a self-sufficient cytochrome P450 enzyme CYP505D6 (D6) from *P. chrysosporium* was characterized. D6 used a series of saturated fatty alcohols with C9 –18 carbon chain lengths as the substrates. Hydroxylation occurred at the ω -1 to ω - 6 positions of such substrates with C9 –15 carbon chain lengths, except for 1 -dodecanol, which was hydroxylated at ω -1 to ω -7 positions. Fatty acids were also substrates of D6. Based on the sequence alignment, the corresponding amino acid of Tyr51, which is located at the entrance to the active site pocket in CYP102A1, was Val51 in D6. To understand this mechanism, wildtype D6 and its V51Y variant, and wildtype CYP102A1 and its Y51V variant were generated, and the products of their reaction with dodecanoic acid analyzed. The products generated by the wildtype CYP102A1 were hydroxylated at ω -1 to ω - 4 positions, whereas its Y51V variant generated ω -1 to ω -7 hydroxydodecanoic acids. These observations indicated that Val51 plays an important role in determining the regiospecificity of fatty acid hydroxylation.

[1]Sakai K *et. al.,* (2018) Appl Environ Microbiol, 84, e01091-18.

Phanerochaete chrysosporium, Cytochrome P450, CYP505D

講演番号：3I03-12
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:00～ ミーティングルーム I

超低栄養性細菌のメタノール脱水素酵素の機能解析

Characterization of a methanol dehydrogenase of an extreme oligotroph

○岸本 真奈、新谷 政己、吉田 信行 (静大院・総合科技)
○Mana KISHIMOTO, Masaki SHINTANI, Nobuyuki YOSHIDA (Grad. Sch. Integr. Sci. Tech., Shizuoka Univ.)

超低栄養性細菌 *Rhodococcus erythropolis* N9T-4 株は炭素・窒素・硫黄源およびエネルギー源無添加の無機塩培地で良好に生育する．これまでに，低栄養条件で際立って発現する遺伝子として *N,N*´-ジメチル-4-ニトロソアニリン依存性のメタノール脱水素酵素（NDMA-MDH）をコードする *mnoA* と，NAD 依存性のアルデヒド脱水素酵素をコードする *aldA* を同定している．*aldA* は本菌の低栄養生育に必須であることから，低栄養生育に関する最重要遺伝子として研究を進めてきた．最近 *mnoA* も本菌の低栄養生育に重要であることが明らかになったため，本研究では，低栄養における MnoA の機能を明らかにすることを目的とした．

His タグを用いて MnoA を精製し，様々なアルコールを基質として MnoA の酵素活性を測定したところ，メタノールには活性を示さず，試験したアルコールの中ではエタノールにのみ活性を示した．最近，グラム陽性菌である *Mycobacterium* 属細菌の NDMA-MDH の電子受容体がマイコファクトシン(MFT)であることが示唆されている．MFT はグラム陰性菌の PQQ に相当する役割を担うと予想され，生合成系も PQQ に酷似していると明らかになっているが，酵素の電子受容体となっている直接的証明は成されていない．本菌の MFT 前駆体ペプチドをコードする *mftA* について欠損株を作製し，その生育を検討したところ，MFT も本菌の低栄養生育に必須であることが明らかとなった．また，この他の MFT 生合成系遺伝子についても検討を行ったので合わせて報告する．

An extremely oligotrophic bacterium, *Rhodococcus erythropolis* N9T-4 can grow on an inorganic basal medium, not containing carbon, nitrogen, and sulfur sources. Previous transcriptome analysis revealed that *mnoA* and *aldA* encoding an *N,N´*-dimethyl-4-nitrosoaniline-dependent methanol dehydrogenase (NDMA-MDH) and an NAD-dependent aldehyde dehydrogenase, respectively, were highly expressed in N9T-4 cells grown under oligotrophic conditions.

In this study, His-tagged MnoA was expressed in N9T-4 and the enzymatic activity of the purified MnoA was measured. MnoA did not have the activity against methanol, but showed the activity against ethanol among alcohols tested. We also examined the oligotrophic growth of deletion mutants for several genes involved in the biosynthesis of mycofactocin, which is suggested to be an electron acceptor of NDMA-MDH of *Mycobacterium smegmatis*.

methanol dehydrogenase, oligotroph, mycofactocin

発表責任者：吉田信行（yoshida.nobuyuki@shizuoka.ac.jp）

講演番号：3I03-13
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:00～ ミーティングルーム I

好熱菌由来色素依存性 L-グルタミン酸脱水素酵素の酵素化学的性質の解析
Characterization of dye-linked L-glutamate dehydrogenase from thermophile

○伊藤 佑衣[1]、里村 武範[2,3]、岩田 峻弥[2]、櫻庭 春彦[4]、大島 敏久[5]、末 信一朗[2]([1]福井大院・工、[2]福井大・工、[3]福井大・生命セ、[4]香川大農、[5]大阪工大)
○ Yui ITO[1], Takenori SATOMURA[2,3], Syunya IWATA[2], Haruhiko SAKURABA[4], Toshihisa OHSHIMA[5], Shin-ichiro SUYE[2] ([1]Grad. Sch. Eng., Fukui Univ., [2]Eng., Fukui Univ., [3]Life Sci. Innov., Fukui Univ., [4]Kagawa Univ. Agric., [5]Osaka Inst. Technol.)

色素依存性 L-グルタミン酸脱水素酵素 (Dye-GDH) は、人工の酸化還元色素をメディエーターとして L-グルタミン酸の酸化反応を触媒する酵素である。本酵素は L-グルタミン酸を検出可能なバイオセンサ用素子としての利用が期待されている。しかしながら、これまでに Dye-GDH の報告例はどの生物種からも無い。そこで、我々は、Dye-GDH のスクリーニングを行った。その結果、好熱菌 *Geobacillus kaustophilus* から Dye-GDH 活性を示すタンパク質を見出した。本研究では、*G. kaustophilus* 由来 Dye-GDH 活性を示すタンパク質の同定と大腸菌によるタンパク質発現系の構築を行った。また、発現した組換えタンパク質の詳細な酵素化学的性質を解析した。

その結果、本酵素は 40 ^{o}C、10 分の処理においては失活せず安定であり、また基質特異性では L-グルタミン酸に高い特異性を示し、人工の酸化還元色素にのみ反応を示すことから、これまで報告されている NAD(P)依存性グルタミン酸脱水素酵素、グルタミン酸オキシダーゼとは異なる新規な Dye-GDH 反応を示すことが明らかになり、グルタミン酸定量用バイオセンサ用素子として高い有用性を示した。また Dye-GDH 活性を触媒する領域を解析するために、Dye-GDH をコードする遺伝子領域を欠損させた変異体を作成し、組換えタンパク質の発現を行った。その結果、Dye-GDH をコードする遺伝子の N 末端側を除去した組換え体の方が、野生型タンパク質よりも高い Dye-GDH 活性を示した。現在、この機構の解析を進めている。

Dye-linked L-glutamate dehydrogenase (Dye-GDH) catalyzes the oxidation of L-glutamate using an artificial dye as a mediator. This type of enzyme is highly expected to be source as a specific element for biosensor. However, No Dye-GDHs have been reported so far. Therefore, we screened for Dye-GDH. As a result, we found enzymes showing Dye-GDH activity from thermophilic bacterium, *Geobacillus kaustophilus*. In this study, we constructed the recombinant protein expression system of the Dye-GDH, and characterized the enzyme.

L-Glutamate, Characterization, Biosensor

発表責任者：里村 武範（satomura@u-fukui.ac.jp）

講演番号：3I03-14
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:00～ ミーティングルーム I

酵素活性が向上した超好熱菌由来ピロロキノリンキノン依存性アルドース脱水素酵素の創製と酵素化学的性質の解明

Construction and characterization of pyrroloquinoline quinone-dependent aldose sugar dehydrogenase with enhanced enzyme activity by directed evolution

○三木 佑介[1]、里村 武範[2]、高村 映一郎[2]、桜庭 春彦[3]、大島 敏久[4]、末 信一朗[2]([1]福井大院・工、[2]福井大学・工、[3]香川大・農、[4]大阪工大・工)
○ Yusuke Miki[1], Takenori Satomura[2], Eiichiro Takamura[2], Haruhiko Sakuraba[3], Toshihisa Ohshima[4], Shin-ichiro Suye[2] ([1]Eng., Fukui Univ., [2]Fukui Univ., [3]Kagawa Univ., [4]Osaka Inst. Tech)

超好熱性アーキア *Pyrobaculum aerophilum* 由来ピロロキノリンキノン (PQQ) 依存性アルドース脱水素酵素 (PQQ-ADH) は、グルコースやマルトースなどの様々な糖の酸化反応を触媒する酵素である。本酵素は 80 ºC、10 min の熱処理でも全く変性しないなどの非常に優れた安定性を持っている。また、本酵素は、人工の電子受容体をメディエータとすることで、基質の電子を電極に伝達することが可能である。これらのことか PQQ-ADH は、バイオ電池やバイオセンサのようなバイオデバイス用素子として有望視されている。しかしながら、本酵素の応用利用の課題として酵素活性の低さが挙げられる。そこで、本研究では分子進化工学的手法を用いて酵素活性が向上した PQQ-ADH 変異体の創製を目的に研究を行った。PQQ-ADH をコードする *pae2689* にランダム変異法と DNA シャッフリング法により変異導入を行った結果、3 つのアミノ酸置換が導入された PQQ-ADH S24 を獲得した。PQQ-ADH S24 を発現した粗酵素液の酵素活性を測定したところ野生型酵素よりも 30 倍高い活性を示した。また、野生型酵素と PQQ-ADH S24 の酵素化学的性質について解析を行った。

Pyrroloquinoline quinone (PQQ) -dependent aldose sugar dehydrogenase (PQQ-ADH) from the hyperthermophilic archaeon, *Pyrobaculum aerophilum* catalyzes the oxidation of various sugars such as glucose and maltose. The enzyme was extremely thermostable, and the activity of the enzyme was not lost after incubation at 80 ºC for 10 min. In addition, the electrons from the substrate extracted by the enzyme reaction can transfer to an electrode via artificial electron acceptor. Therefore, PQQ-ADH is promising as a specific element for biodevice such as biosensor and biofuel cell. However, the application to the biodevices has been limited due to its low enzyme activity. In this study, we aimed to construct PQQ-ADH mutant with high enzyme activity using molecular evolution engineering techniques. As a result, PQQ-ADH S24 mutant with 30-fold higher enzyme activity compared with the wild type enzyme was obtained. We analyzed the enzymatic properties of PQQ-ADH S24 and compared to that of wiled type enzyme.

Glucose dehydrogenase, Screening, Molecular evolution engineering

発表責任者：里村武範（satomura@u-fukui.ac.jp）

講演番号：3I03-15
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:00～ ミーティングルーム I

リンゴ酸デヒドロゲナーゼの構造変化による触媒残基の switching と基質特異性への寄与

Switching of catalytic residue of malate dehydrogenase by structural change and contribution to its substrate recognition

○下澤 勇弥[1,2]、中村 努[2]、氷見山 幹基[2]、佐々本 康平[1,2]、西矢 芳昭[1]([1]摂南大院　理工　生命、[2]国立研究開発法人産業技術総合研究所)
○Yuya SHIMOZAWA[1,2], Tsutomu NAKAMURA[2], Tomoki HIMIYAMA[2], Kohei SASAMOTO[1,2], Yoshiaki NISHIYA[1] ([1]Grad. School. Sci. Eng. Setsunan Univ., [2]AIST)

【背景】Malate dehydrogenase (MDH) は、NAD(P)H 依存的にオキサロ酢酸から L-リンゴ酸への可逆的反応を触媒する酸化還元酵素である。MDH は、活性部位に柔軟性の高い mobile loop と触媒残基が存在する catalytic loop を有する。Mobile loop は、活性部位に補酵素が結合した後、基質結合により open 構造から closed 構造に構造変化することがよく知られている。また、MDH のホモログとして、lactate dehydrogenase (LDH) が知られている。両酵素は、類似した触媒機構と立体構造を有する一方で、基質特異性は大きく異なる。本研究では、*Geobacillus stearothermophilus* 由来の MDH (gs-MDH) の結晶構造を基に構造変化メカニズムを推察し、LDH との構造比較により基質特異性との関係について考察した。【結果・考察】gs-MDH の結合リガンドと mobile loop のコンフォメーションが異なる４つの結晶構造を決定した。それらの構造比較は、mobile loop の構造変化により誘導される catalytic loop の活性化を示した。一方で、LDH は open 構造でも catalytic loop が活性型を示した。これらの結果は、構造変化が MDH の高い基質特異性に重要な役割を担うことを示唆している。

【Background】Malate dehydrogenase (MDH) catalyzes the reversible reduction from oxaloacetate to L-malate using NADH. The active site of MDH has the mobile loop, which has high flexibility, and the catalytic loop, which contains the catalytic residue. The mobile loop undergoes the structural change from open-form to closed-form by the substrate-binding. As the homologous enzyme of MDH, lactate dehydrogenase (LDH) is known to have a similar catalytic mechanism and three-dimensional structure with MDH, while the substrate specificities of those differ significantly. In this study, we suggested the structural change mechanism based on the crystal structure of MDH from *Geobacillus stearothermophilus* (gs-MDH) and discussed the substrate specificity by structural comparison with LDH.
【Results/Discussion】The four crystal structures of gs-MDH, which differed in the binding ligand and the mobile loop conformation, were determined, a switching of the catalytic loop induced by the structural change of the mobile loop was indicated. In contrast, the catalytic loop of LDHs indicated a similar conformation with the closed-form of gs-MDH even in the open-form. Those results suggest that the structural change is a key role in the high substrate specificity of MDH.

malate dehydrogenase, conformational change, substrate recognition

発表責任者：西矢芳昭（nishiya@lif.setsunan.ac.jp）

講演番号：3I03-16
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:00～ ミーティングルームⅠ

グリシンオキシダーゼの構造・機能解析と酵素特性改良

Structural and functional analysis of glycine oxidase, and improvement of enzymatic properties

○東浦 優希[1]、小田 龍佑[2]、川崎 大志[2]、西矢 芳昭[1,2]([1]摂南大院理工生命、[2]摂南大理工生命)
○Yuki Higashiura[1], Ryusuke Oda[2], Taishi Kawasaki[2], Yoshiaki Nishiya[1,2] ([1]Grad. School. Sci. Eng. Setsunan Univ., [2]Sci. Eng. Setsunan Univ.)

【背景および目的】グリシンオキシダーゼ(Gox)はグリシンの酸化的脱アミノ化を触媒する酵素で、生体内においてチアミン合成の初発酵素として働く。チアミンはピリミジン部とチアゾール部が別々の経路で合成され、Gox の生成物であるイミノグリシンはチアゾールの一部となる。イミノグリシンは水との反応性が高く、すぐに分解される。Gox はイミノグリシンを効率的に次反応へと渡すため、低ターンオーバーへと進化したと予想される。

Gox はグリシン測定への応用が可能であり、さらにわれわれは本酵素による特殊健康診断用新規馬尿酸測定法を開発した。本研究では Gox の分析用酵素としての改良を目指し、課題である基質阻害と低比活性の立体構造ベースでの原因究明、およびタンパク質工学による機能改変を行った。

【結果・考察】*Geobacillus kaustophilus* 由来 Gox の結晶構造（PDB ID：4YSH）より、活性中心の R336 が Open-Closed 構造変換を担っていると推測された。Closed 構造の活性中心には、反応性のグリシン以外にも非反応性グリシンが一部結合していた。また、R336 の近傍に存在する E55 は、Open-Closed 構造間で顕著な配向の違いが見られた。これらの知見を基に作製した E55A や E55Q、そして非反応性グリシン結合部位を狭めた G251I では基質阻害が低減あるいは消失し、比活性は G251I において 3～4 倍向上した。

これらの結果より、R336 と非反応性グリシンおよび E55 との相互作用により Closed 状態が安定化し、Open 構造への移行が遅延することで低ターンオーバーや基質阻害が生じると考えられた。

Glycine oxidase (Gox) catalyzes the oxidative deamination of glycine. Gox can be applied to glycine measurement and a new hippuric acid assay reported in our previous study.

The crystal structure of Gox from *Geobacillus kaustophilus* (PDB ID :4YSH) suggested that the interaction of E55 and R336 in the active site played an important role in the open-closed structure conversion. On the other hand, a non-reactive glycine was partially observed with a reactive glycine in the active center of the closed form. Mutational analysis of Gox indicated that the interactions of R336 with non-reactive glycine and E55 were likely to inhibit the closed-to-open transition.

These results supported to improve the low turnover and substrate inhibition.

glycine oxidase, protein engineering, crystal structure

講演番号：3I03-17
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:00～ ミーティングルーム I

SH 基化学修飾によるオキシダーゼのデヒドロゲナーゼへの改変

Alteration of oxidase to dehydrogenase by the SH group chemical modification

○外山 二卯佳、木村 太紀、西矢 芳昭（摂南大　理工　生命）
○Fuka TOYAMA, Hironori KIMURA, Yoshiaki NISHIYA (Sci. Eng. Setsunan Univ.)

【背景および目的】　現在の臨床検査用酵素の開発は、タンパク質工学による機能改変がルーチンとなっている。その先駆けとして、腎機能評価マーカーであるクレアチニンの測定用酵素サルコシンオキシダーゼ（Sox）がタンパク質工学により機能改良され、1994 年に商品化された。既に実用化されていた *Arthrobacter* 属細菌由来 Sox（SoxA）は優れた酵素特性を有したが、臨床検査用抗菌剤により失活したため、原因究明と部位特異的変異での改良が試行された。活性低下の原因が抗菌剤によるシステイン残基（C264）の SH 基化学修飾と分かり、作成された変異体 C264S は抗菌剤存在下で活性を維持し、且つ野生型と同様の酵素特性を保持した。そこで本改良酵素が上市され、現在では世界的に普及している。

しかし、SH 基修飾での失活の原因は不明で、当時は Sox の立体構造が決定されておらず、構造的解釈もされないままであった。本研究では、SoxA の SH 基化学修飾による活性低下の原因を解明し、立体構造ベースで考察した。

【結果と考察】　われわれは、SoxA の立体構造予測により C264 が補酵素 FAD の基質結合面の反対側に存在し、且つ活性中心から 16 Å 以上離れていることを見出した。また、SoxA は SH 基修飾抗菌剤で処理しても変性せず、CD スペクトルの変化も見られなかった。そこで修飾 SoxA の詳細な活性測定を行ったところ、未修飾 SoxA に比べオキシダーゼ活性は低下し、デヒドロゲナーゼ活性は逆に増加した。溶存酸素消費や吸光度スペクトル解析からも、SH 基修飾は酸素との反応を阻害することが明確となった。

立体構造モデルから、本オキシダーゼの特定システイン残基が SH 基修飾剤により化学修飾されることで、酸素分子の活性中心への通路の入り口を塞ぎ、酸素反応性の大幅低下に至ったと考察した。また、修飾酵素の特性が理解できたことで、オキシダーゼの溶存酸素反応性の課題が解決され、クレアチニン測定センサや前立腺癌マーカーであるサルコシン測定センサへの応用が期待される。

In this study, a sarcosine oxidase inactivated by chemical modification was characterized. The SH group modification markedly reduced the enzyme reaction with oxygen, while it did not affect the reaction with sarcosine. Based on the tertiary structural model, the modification site was more than 16 Å away from the active center and was expected to be located at an entrance to the passage of oxygen molecules. As a result of this study, the development of practical dehydrogenase by chemical modification of oxidase was shown.

chemical modification, oxidase, dehydrogenase

発表責任者：西矢芳昭（nishiya@lif.setsunan.ac.jp）

講演番号：3I03-18
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:00～ ミーティングルームⅠ

好熱菌ラッカーゼによる食品タンパク質の架橋解析

Protein crosslinking of food protein mediated by thermophilic laccase

○安藤 兼那太、時下 進一、熊澤 義之（東薬大生命）
○Kanata ANDO, Shinichi TOKISHITA, Yoshiyuki KUMAZAWA (Tokyo Univ. Pharmacy and Life Sciences)

食品加工酵素において現在使用されているタンパク質架橋酵素は微生物のトランスグルタミナーゼのみである．食品加工のアプリケーションを広げるために，新規タンパク質架橋酵素の研究が行われており，フェノールオキシダーゼであるラッカーゼが着目されている．そこで，熱安定性が高く，高温においても活性を有するラッカーゼとして，好熱菌のラッカーゼに着目した．*Thermus thermophilus* HB27 のラッカーゼ(HB27-Lac)を大腸菌のタンパク質発現系を用いて生産・精製を行ない，pH6, 60℃において大豆タンパク質，乳タンパク質，乾燥卵白に対する架橋実験を行った.ラッカーゼ単独では顕著なタンパク質架橋能を示さなかったが，２価の銅イオンとメディエーターであるフェルラ酸の添加により，大豆タンパク質，乳タンパク質，乾燥卵白に対する架橋能が認められた．さらに抗ジチロシン抗体によるウエスタンブロットにより架橋された大豆タンパク質中に，ジチロシンが形成されていることが示され，少なくともメディエーター存在下で，ラッカーゼによりチロシン残基同士が架橋されていることが明らかとなった．現在，より高活性のラッカーゼを創出するため，*T. thermophilus* HB27 の L1 ループを *T. thermophilus* SG05JP17_16 の L1 ループに置換したキメララッカーゼ（Chimera-lac）を作製し，生化学的特性を解析中である．キメララッカーゼの生化学的特性および大豆タンパク質に対する架橋解析の結果も合わせて報告する．

Microbial transglutaminase mediates crosslink between lysin and glutamine residues of proteins. It is only protein crosslinking enzyme in food processing. Increasing multiple demands in food processing application, the development of several protein crosslinking enzymes is necessary for improvement of the food texture in the field of food science. We focus on the thermostable laccase of *Thermus thermophlus* HB27 (HB27-lac), which belong to the phenoloxidase family and multi-copper protein. This thermostable laccase was produced using *Escherichia coli* expression system and purified homogeneously. As a result of analyzing whether HB27-lac can cross-link soy protein, dairy protein, and dry egg white protein or not, HB27-lac was able to cross-link these proteins with containing ferric acids and bivalent copper ion. The di-tyrosine was formed in the crosslinking soy proteins. Furthermore, chimeric protein of laccase was constructed from amino acids sequence of *T. thermophlus* HB27 and *T. thermophlus* SG05JP17_16 (Chimera-lac). Under analyzing biochemical characterization and protein crosslinking activity of Chimera-lac, these results will be reported at the meeting.

Thermophile enzyme, Laccase, Food protein crosslinking

講演番号：3I05-01
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 11:00～ ミーティングルーム I

The interactions between *Pteris vittata* and its rhizosphere contribute to As phytoextraction

○ CHONGYANG YANG[1,2], NING HAN[1], YING-NING HO[3], YU-LIANG YANG[4], HIDEAKI NOJIRI[2], MEI-FANG CHIEN[1], CHIHIRO INOUE[1] ([1]Tohoku Univ., [2]BRC UTokyo, [3]NTOU. Taiwan, [4]Academic Sinica. Taiwan)

Arsenic (As) is a toxic and carcinogenic metalloid, which is widely distributed and posed threat to human health. Phytoextraction is an inexpensive method to remove As from contaminated soil using plants and associated microorganisms. *Pteris vittata* is the most famous and studied As hyperaccumulator, which efficiently absorbs As as arsenate via roots. Therefore, rhizosphere where As solubilization and speciation occurs prior to be absorbed may play key roles in As phytoextraction by *P. vittata*. The aim of this study was to investigate the potential and interaction of *P. vittata* and associated microorganisms during As phytoextraction. *P. vittata* seedlings with height of 15 cm to 20 cm were planted in 600 g of As contaminated soil (60 mg kg^{-1}) in into plastic pots with mean diameter of 12.4 cm and height of 13.3 cm for three months. The biomass and As content of *P. vittata* was measured, and the pH, soluble As, microbial community and metabolite in rhizosphere of *P. vittata* were analyzed every month. Both biomass and As concentration in the plant were found increasing over time. Plant growth exhibited a great trend in the second month and might be limited in the third month due to the pot size. Meanwhile, the water-soluble As concentration got increased and corresponding pH values decrease occurred in rhizosphere in second month, which suggested that increased acid metabolites might lead to As solubilization. The variation of microorganisms and metabolites in rhizosphere of *P. vittata* with time was also investigated in this closed system. And a correlation was built to elucidate the interactions among metabolites, bacteria and fungi in rhizosphere of *P. vittata* during the process of As phytoextraction. Our results demonstrated the *P. vittata* was the major drive force to shift the structure of microflora, and a profile of compounds contributed by culturing of *P. vittata* was found which may correlate to As solubilization and speciation. This study extends the current view on the synergistic effect of hyperaccumulators and its rhizospheric microorganisms in phytoextraction, which provide hints toward efficient As phytoextraction approaches development.

Pteris vittata, Arsenic, Phytoextraction

講演番号：3I05-02
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 11:00～ ミーティングルーム I

根圏メタボロミクス解析を起用したヒ素のファイトエキストラクション過程における代謝産物および代謝経路の調査

Appointment of rhizosphere metabolomics approach to investigate metabolites and metabolic pathways during arsenic phytoextraction

○韓 凝[1]、楊 重陽[1,2]、ホ インニン[1,3]、楊 玉良[4]、簡 梅芳[1]、井上 千弘[1] ([1]東北大院・環境、[2]東大・生物工学セ、[3]国立海洋大学、[4]中央研究院)
○Ning HAN[1], CHONGYANG YANG[1,2], Ying-Ning HO[1,3], Yu-Liang YANG[4], Mei-Fang CHIEN[1], Chihiro INOUE[1] ([1]Tohoku Univ., [2]BRC UTokyo, [3]NTOU. Taiwan, [4]Academia Sinica. Taiwan)

根を介して重金属を吸収し、地上部に蓄積するファイトエキストラクションは金属の超蓄積植物によるファイトレメディエーションのサブプロセスの一つである。そのため、ファイトエキストラクションを制御するには、根圏に起きている複雑な生化学反応を理解することは必須と考えられる。一方、メタボロミクス手法は複雑な生体反応（代謝）を解明する有用な手法として知られ、医学分野において応用例が増えてきているが、環境研究においてはまだ発展途中である。本研究は、ヒ素の超蓄積植物によるヒ素吸収過程における根圏中代謝産物の変化および代謝経路の解明を目的として、非標的メタボロミクス解析を起用して調査した。

ヒ素の超蓄積植物として最も研究されてきたモエジマシダ（*Pteris vittata*）を試供植物とし、日本国内に採取した土壌（ヒ素含有量約 60 mg/kg）を入れたポットに三ヶ月間の栽培実験を行った。毎月に採取した根圏とバルクの土壌を、水:メタノール=3:1 の溶液により代謝物を抽出し、LC-MS/MS を用いて根圏・土壌の代謝物を網羅的に分析した。顕著に変化した物質を絞り込むために、判別分析の解析を行った。さらに、MS/MS スパクトルに基づいた *in silico* の構造推定手法を用いて、20 種類以上の代謝物質を同定した。現在は代謝経路の分析に取り掛かっており、発表ではその過程と結果を紹介する。

Phytoextraction is a common subprocess of metal phytoremediation, in which hyperaccumulators absorb heavy metals via roots, then transport and concentrate into above-ground shoots. To understand the biochemical reactions in the rhizosphere is considered essential to enhance the efficiency of phytoremediation. On the other hand, metabolomics is known as an approach in medical field to investigate complex biochemical reactions, while its application in environmental studies is still limited. The present study aimed to elucidate the metabolic changes in rhizosphere during phytoextraction by appointing non-targeted metabolomics methods. A three-month cultivation experiment in pots using the most studied arsenic hyperaccumulator, *Pteris vittate* with soil collected from a field in Japan (arsenic concentration 60 mg kg^{-1}) was conducted. Rhizosphere and bulk soils were collected every month, and soil metabolites were extracted with a solution of water: methanol = 3: 1. The metabolites were detected by LC-MS/MS. Metabolites with apparent changes had been narrow down through a model of discriminant analysis. More than 20 metabolites were identified by *in silico* tools based on MS/MS spectrum. Further analysis including pathway analyzing will be introduce in the presentation.

Phytoremediation, metabolomics, *Pteris vittata*

発表責任者：簡梅芳（meifangchien@tohoku.ac.jp）

講演番号：3I05-03
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 11:00～ ミーティングルーム I

シロイヌナズナ根の形態形成に及ぼすレアアースの影響

Effect of rare earths on *Arabidopsis* root morphogenesis

○武田 徹[1,2]、松田 旭生[1]、小嶋 えみり[1]、高貝 俊生[2] ([1]近畿大農、[2]近畿大院農)
○Toru Takeda[1,2], Teruki Matsuda[1], Emiri Kojima[1], Toshiki Takagai[2] ([1]Kindai Univ., [2]Grad school Agri Kindai)

レアアースは、多くの工業製品に必要不可欠な金属元素であり、産業のビタミンとも呼ばれている。その中でもランタン（La）およびセリウム（Ce）は、地殻中存在量が亜鉛や鉛等のベースメタルと同等かそれ以上であり、そのため、生物に直接的に作用していると考えられている。中国では、肥料として La が利用されており、また、インゲンマメにおいて、適量の Ce が植物の生理生化学に正の影響を与えることが報告されているが、その詳細な作用機構は不明である。そこで本研究では、植物における La および Ce の毒性機構、および新規生理機能の可能性を解明する事を目的とし、モデル植物であるシロイヌナズナを用いて、植物の生育や形態形成に及ぼす La および Ce の影響を検討した。

La あるいは Ce 添加培地でシロイヌナズナを生育させたところ、低濃度（1 μM）から高濃度（250 μM）添加群に至るまで、シュートにほとんど影響は認められなかった。一方、根は、1 μM La 添加群および 1～10 μM Ce 添加群において、主根の有意な伸長促進が認められ、高濃度（100 μM＜）La および Ce 添加群では、主根の顕著な伸長阻害が認められた。また、高濃度 La および Ce 添加群の根では、側根の形成頻度が大きく増加していた。低濃度から高濃度の La および Ce 添加群のシュートにおいて、H_2O_2 の蓄積および過酸化脂質の生成はほとんど認められなかったが、高濃度 La および Ce 添加群の根では、過酸化脂質が有意に蓄積していた。また、主根の根端における H_2O_2 の蓄積が La および Ce の添加濃度依存的に増加していた。さらに、Ce 添加群の葉のトライコームに H_2O_2 の蓄積が認められた。

Among rare earths, lanthanum (La) and cerium (Ce) have an abundance in the crust equal to or higher than that of base metals such as zinc and lead. Therefore, it is thought that it acts directly on living organisms, but the mechanism of action on plant physiology and biochemistry is unknown. Therefore, in this study, we investigated the effects of La and Ce on growth and morphogenesis using *Arabidopsis thaliana*, which is a model plant.

When *A. thaliana* was grown in La or Ce-added medium, almost no effect was observed on shoots from the low concentration (1 μM) to the high concentration (250 μM) addition group. On the other hand, significant promotion of main root elongation was observed in the 1 μM La-added group and the 1-10 μM Ce-added group, but the main root elongation was significantly inhibited in the high-concentration (100 μM <) La and Ce-added groups. Furthermore, in the high-concentration La and Ce-added groups, the frequency of lateral root formation was significantly increased.

lanthanum, cerium, rare earths

発表責任者：武田　徹（t_takeda@nara.kindai.ac.jp）

講演番号：3I05-04
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 11:00～ ミーティングルーム I

High-throughput screening of antibiotic-resistant genes in an urban river, Kanda River by metagenomic analysis

○ Chang Xiao[1], Keigo Ide[1,2], Ryota Wagatsuma[1], Yohei Nishikawa[2,3], Hiroko Matsunaga[3], Daisuke Tominaga[2], Haruko Takeyama[1,2,3,4] ([1]Grad. Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ., [2]CBBD-OIL, AIST-Waseda Univ., [3]Res. Org. Nano Life Innov., Waseda Univ., [4]Inst. Adv. Res. Biosyst. Dynam., Waseda Res. Inst. Sci. Eng., Waseda Univ.)

The emergence and spread of antibiotic resistant genes (ARGs) among pathogenic and non-pathogenic bacteria have been a rising threat in recent decades. Among suspected sites for resistance transmission are urban wastewater, where the microbes from different sources are in close contact and then release into the environment. The occurrence of antibiotics may promote the selection of ARGs and antibiotic resistant bacteria (ARB) via horizontal gene transfer, which may shade health risks to humans and animals. An increase in concentrations of antibiotics and ARG in rivers has repeatedly been found which leads rivers to an active field of research. The Kanda River, which is a partially engineered waterway with approximately 25 kilometers that starting at Inokashira Park in Kichijoji and merging into the Sumida River in the east running through the center of Tokyo Prefecture. It receives a huge amount of domestic wastewater, which may harbor high diversity of pathogenic bacteria that threaten the health of the surrounding citizens.

The metagenome sequencing of whole microbial communities has been widely applied in environmental health monitoring and ARG risk assessment nowadays, and it could reveal genomic information from the vast majority of unculturable bacteria compared to conventional methods.

In this study, water samples were collected in 11 points in Kanda River almost every month from December 2019 to November 2020. The 16S rRNA sequencing and Shotgun metagenomic sequencing are both applied for 1) studying the variations in river bacterial communities, 2) identifying the relationship between environmental factors and microbial structure, 3) profiling ARGs and antibiotic resistome and 4) studying the correlation of antibiotic resistomes and dominant phyla. Our study shows that the abundance and diversity of ARGs and microbes showed spatial and temporal variations.

Antibiotic resistant genes, Metagenomic analysis

講演番号：3I05-05
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 11:00～ ミーティングルーム I

各種プラスチック存在下における下水汚泥中細菌叢の変化

Change of Bacterial Community in Sewage Sludge in the Presence of Plastics

○北村 雄真、前田 憲成、むすたふぁ ぬるる・あしふぁー (九工大院生命体)
○Yuma KITAMURA, Toshinari MAEDA, Nurul Asyifah MUSTAPHA (Kyutech)

マイクロプラスチック問題は、世界で最も注目されている環境問題の一つである。特に、魚介類などの海洋生物は、マイクロプラスチックを取り込んで体内に蓄積することにより、脂質の代謝異常を引き起こすとされている。またプラスチックの生分解には数百年かかるとされているため、これらを劣化させ、分解を促進することができるようなバイオレメディエーション技術の構築が必要とされている。近年、ポリエチレンテレフタレート分解菌などが報告されるようになってきたが、プラスチックによる細菌叢への影響を調査している文献は少ない。本研究では、多種多様な菌群が存在する下水汚泥を細菌群として用いて、3種類のプラスチック（ポリプロピレン、ポリエチレン、およびポリエチレンテレフタレート）を添加した系で集積培養を行い、それらの生分解性及び中期間の培養による細菌叢への影響を調査した。結果として、2ヶ月間の培養で、各プラスチックには重量減少や構造変化等が見られず、プラスチックの有無で汚泥中の生菌数も変化しなかったが、細菌群集の多様性は変化していることが確認された。特にプラスチックの重量現象は見られていなかったが、それぞれのプラスチックに特有の菌叢に変化しているという、興味深い結果が得られた。

The issue of microplastics is one of the biggest concerns in the world; in particular, the uptake of microplastics to marine organisms such as fish and shellfish triggers the aberration of lipid metabolism by accumulating the plastics inside the body. Therefore, a bioremediation technology
able to degrade plastics should be constructed in the future. Several reports describe that some bacteria are able to degrade polyethylene terephthalate; however, there are still a few number of publications how the plastics will influence bacterial community. In this study, sewage sludge was used because not only a large number of bacteria but also a variety of unique bacteria have been found in the sludge. Therefore, enriched cultivation was conducted in this study in the presence of three different types of plastics (polypropylene, polyethylene, and polyethylene terephthalate) to cultivate some bacteria capable of degrading the plastic materials or to observe the change of bacterial community by the plastics. As a result, no weight loss or structural change was observed after 1-month incubation in each plastic, and the number of viable cells in the sludge did not change with or without each plastic; however, interestingly, a different bacterial community and diversity was observed in each plastic. The result may be important to facilitate the degradation of plastics.

microplastic, waste water treatment sludge, microorganisms

発表責任者：北村雄真（q109027y@mail.kyutech.jp）

講演番号：3I05-06
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 11:00～ ミーティングルーム I

有機物含有廃水における硝化能および微生物叢の変化

Changes in nitrification ability and microflora in organic matter-containing wastewater

○飯山 桃子[1]、山下 栞[2]、牧野 陽介[1]、三浦 健[1,2] ([1]東洋大院・生命科学、[2]東洋大・生命科学)
○Momoko IIYAMA[1], Shiori YAMASHITA[2], Yosuke MAKINO[1], Takeshi MIURA[1,2] ([1]Graduate School of Life Sciences, Toyo Univ., [2]Faculty of Life Sciences, Toyo Univ.)

【背景・目的】近年、東南アジアの河川水において高濃度のアンモニア態窒素（NH_4-N）および有機物による汚染が問題となっている。NH_4-N の除去には主に独立栄養細菌であるアンモニア酸化細菌（AOB）や亜硝酸酸化細菌（NOB）と呼ばれる硝化菌が関与している。当研究室において、河川水および土壌を種菌としてそれぞれ RUN1 および RUN2 として担体投入型硝化槽を立ち上げ、315 日間連続処理運転を行った。反応槽内の担体を取り出し、メタ 16S rRNA 解析による菌叢構造解析を行ったところ、AOB である *Nitrosomonas* 属と NOB である *Nitrospira* 属が高い占有率を占めていた。本研究では、これらの担体を用いて新たな硝化槽を立ち上げ、有機物含有下における硝化特性の検討および NH_4-N 処理能の変化に着目して反応槽内の菌叢構造の変化を解析した。
【結果・考察】反応容積 1.15 L にそれぞれ馴養した担体を添加し、RUN1 および RUN2 とした。原水 NH_4-N 濃度は 10 mg/L とした。滞留時間および全有機体炭素（TOC）濃度を段階的に短縮および増加させ、処理能が低下したタイミングで TOC 濃度を元に戻した。最大 TOC 濃度 50 mg/L に変更直後に RUN1 において処理水 NH_4-N 濃度 7.33 mg/L、RUN2 において 7.43 mg/L まで水質が悪化した。TOC 濃度を 10 mg/L に戻すと NH_4-N 濃度の処理能の再生が見られた。メタ 16S rRNA 解析は TOC 濃度 50 mg/L に変更前後および処理能が再生したタイミングで行った。TOC 濃度の変化によって反応槽内の微生物叢に影響を及ぼした可能性が示唆された。
【Background・Purpose】In recent years, pollution by high concentrations of ammonia nitrogen (NH_4-N) and organic matter has become a problem in river waters in Southeast Asia. In this study, we analyzed changes in the flora structure in the reactors, focusing on the investigation of nitrification characteristics in the presence of organic matter and changes in NH_4-N treatment performance.
【Result・Discussion】The acclimatized carriers were placed in a reaction volume of 1.15 L to prepare RUN1 and RUN2. The concentration of raw water NH_4-N was 10 mg/L. Immediately after changing to the maximum total organic carbon (TOC) concentration of 50 mg/L, the water quality deteriorated to 7.33 mg/L in treated water NH_4-N concentration in RUN1 and 7.43 mg/L in RUN2. It was suggested that changes in TOC concentration may have affected the microflora in the reactors.

16S rRNA-based metagenomics analysis, nitrification, Total organic carbon (TOC)

発表責任者：飯山桃子（s39102000038@toyo.jp）

講演番号：3I05-07
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 11:00～ ミーティングルーム I

微生物群集解析による生分解性プラスチック分解の影響

Influence of Biodegradable Plastic Degradation by Microbial Community Analysis

○門屋 亨介[1]、田中 尚人[2]、藤田 信之[2]、志波 優[2]、田口 精一[2]([1]椙山女学園大生活科学、[2]東京農大生命科学)
○ Ryosuke KADOYA[1], Naoto TANAKA[2], Nobuyuki FUJITA[2], Yuh Shiwa[2], Seiichi Taguchi[2] ([1]Sugiyama Jyogakuen Univ., [2]Tokyo University of Agriculture)

石油由来プラスチックが環境に及ぼす影響として、海洋中に流出した漁網やロープなどが海洋生物に絡みつくなどの物理的な現象に加え、完全に分解しきれないで残存することが地球規模での環境問題となっている。特に最近では、5mm 以下のサイズの「マイクロプラスチック」が河川や海洋など水環境で蓄積していることが問題視されている。これらプラスチック問題は工業分野にとどまらず、多岐な分野でその対策を進めることが推奨されている。このような石油由来プラスチック問題解決の一つとして、生分解性バイオプラスチックに注目が集まっている。環境中に放出されたプラスチックの分解性は、これまでは培養可能な微生物あるいは分泌分解酵素のレベルで評価されてきた。

本研究では、水環境中における細菌叢（培養不能の細菌多様性）の変化を指標に、生分解性プラスチック（微生物ポリエステルであるポリ 3-ヒドロキシ酪酸：P(3HB)）の分解が環境に及ぼす影響を観察した。4 点の河川水サンプル中の P(3HB)分解の進行は、その重量変化や表面構造の変化を経時的に測定して評価した。また、分解に伴い変化する河川水中の細菌叢は、次世代高速シークエンサーを用いたメタゲノム解析によって行った。その結果、河川中に P(3HB)を投入した直後に大きな動的菌叢変化が生じた。本研究で得られた結果は、生分解性プラスチック利用における水環境面の検討における重要な知見となる。

The plastic disposal is one of the global problems coming across the various environments, as vast amounts of synthetic plastic remain completely non-degradable. Especially, the accumulation of “micro-plastics” in river or sea water is a representative current problem. One solution for overcoming this global problem is the development and utilization of biodegradable plastics. The addition effects of polymeric materials on natural environments have been mainly evaluated in terms of the relationships between the culturable polymer-degrading microorganisms and their secreted enzymes, and target materials. In this study, we applied metagenome analysis to better understand the change in unculturable microorganismal biodiversity in the four different river samples by using microbial poly(3-hydroxybutyrate) [P(3HB)], a well-studied biodegradable plastic. The metagenomic analysis has provided us useful insights into the dynamic changes in the microbial community in the river samples and is applicable for various combinations of environments and biopolymers.

Ref: R. Kadoya, et al. Polymer Degradation and Stability (2020)176: pp-109144

Biodegradable Plastic, Microbial Community Analysis, Microplastics

発表責任者：門屋　亨介（rkadoya@sugiyama-u.ac.jp）

講演番号：3I05-08
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 11:00～ ミーティングルーム I

Pseudomonas saccharophila を用いた水溶液からのタングステン酸イオンの除去と回収

Removal and recovery of tungstate ion from aqueous solution using *Pseudomonas saccharophila*

○鶴田 猛彦[1]、屋須 雅人[1]、田口 翔太[1]、宮里 匠[2] ([1]八戸工大工、[2]八戸工大院工)
○Takehiko TSURUTA[1], Masato YASU[1], SHOTA TAGUCHI[1], Sho MIYASATO[2] ([1]Hachinohe Inst. Tech., [2]Grad. Sch. Hachinohe Inst. Tech.)

タングステンはレアメタルの一種であり、資源に乏しい我が国においては回収が望まれる金属の一つである。タングステンは鉱物としては酸化タングステン(VI)として産出されており、本研究ではタングステン酸ナトリウムの水溶液の pH を硝酸または水酸化ナトリウムで調節して使用した。

Pseudomonas saccharophila の一菌株を用いてタングステン酸水溶液からのタングステン酸の除去について検討した。微生物は肉エキス、ポリペプトン、グルコースを含む培地に植菌後、30℃で 3 日間振とう培養後、遠心分離にて集菌し、純水で 3 回洗浄したものを休止菌体として、この休止菌体の一定量を実験に供するとともに、休止菌体を 80℃で 2 時間乾燥したものをその乾燥菌体重量として計測し、乾燥菌体換算重量として評価に使用した。

まず、*P. saccharophila* によるタングステン酸除去に及ぼす pH、微生物菌体量、接触時間の影響について検討した。

これらの検討結果から *P. saccharophila* 菌体は高いタングステン酸除去能が認められたので、本菌株を用いて、アクリルアミドで包括固定化した固定化菌体を用い、タングステンを吸着した固定化 *P. saccharophila* を用いて炭酸ナトリウム水溶液を脱着液とする脱着回収を試みたところ良好な結果が得られたので、脱着回収の結果も併せて報告する。

Removal and recovery of tungsten from aqueous sodium tungstate solution using *Pseudomonas saccarophila* was examined.

At first, some factors affected tungsten removal, such as pH of the solution, cell amount, and contact time, were examined. The amount of tungsten removed was maximal at pH 2-3, especially pH 3. The amount of that was decreased at pH 1 and over pH 4, and almost of that was not removed at pH 5.

The amount of tungsten removed (%) was increased with increasing the cell amount, whereas the amount of tungsten removed (micromole-W/g-dry wt. cells) was decreased.

Half amount of tungsten was removed within 1 h, however, the removal of tungsten was reached equilibrium about 25 h.

As *P. saccharophila* can be removed large amount of tungstate ion, we examined desorption from tungsten adsorbed immobilized *P. saccharophila* cells with poly acryl amide gel was examined. This immobilized cell can be adsorbed large amount of tungstate ion and desorbed quantitatively by sodium carbonate solution as desorbent.

Removal and recovery, Tungstate ion, *Pseudomonas saccharophila*

発表責任者：鶴田猛彦（tsuruta@hi-tech.ac.jp）

講演番号：3I05-09
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 11:00～ ミーティングルーム I

生物鉱物化ペプチド提示シルクによるレアアースの直接回収

Direct recovery of the rare earth element using a silk displaying a biomineralization peptide.

○石田 亘広[1]、畠中 孝彰[1]、細川 洋一[1]、小島 桂[2]、飯塚 哲也[3]、寺本 英敏[2]、瀬筒 秀樹[3]、亀田 恒徳[2] ([1]豊田中研、[2]農研機構・新素材開発、[3]農研機構・カイコ機能改変)
○Nobuhiro ISHIDA[1], Takaaki HATANAKA[1], Yoichi HOSOKAWA[1], Katsura KOJIMA[2], Tetsuya IIZUKA[3], Hidetoshi TERAMOTO[2], Hideki SEZUTSU[3], Tsunenori KAMEDA[2] ([1]TOYOTA Cent. R&D Labs., [2]NARO, Silk Mater. Res. Unit, [3]NARO, Transgenic Silkworm Res. Unit)

レアアースは先端材料に必須な金属資源であるが、分離回収に課題がある。一方で生物は、自然環境下から特定の金属イオンのみを選択的に認識して鉱物化する能力（バイオミネラリゼーション）を有しており、これまでに我々は本機能を模倣したレアアース鉱物化ペプチドについて報告している[1)]。本発表では、レアアース鉱物化ペプチドを共発現する遺伝子組換えカイコを作製し、カイコが生産するシルクを活用した新しいレアアース回収技術について提案する[2)]。

我々は、シルクの主成分であるフィブロイン L（FibL）下流にレアアース鉱物化ペプチド（Lamp1）が融合するようベクターを設計し、*piggy Bac* システムによってカイコ染色体中へ導入した。遺伝子組換えカイコが生産する融合タンパク質にレアアースイオンを添加したところ、Lamp1 が付加されたタンパク質にのみレアアースを含む沈殿が認められた。続いて、セリシンを除去して粗粉砕したシルクにレアアースイオンを添加した結果、シルク表面へのレアアース吸着が認められ、弱酸性溶液による洗浄を経ることで再利用できることを確認した。本知見は、海水や工場排水に含まれる低濃度のレアアースを低エネルギーで回収できるシステム構築につながることが期待される。

1) Hatanaka et.al, *Nature Communications*, 8:15670, 2017.
2) Ishida et.al, *Molecules*, 25(3) 761, 2020.

Rare earth (RE) elements are indispensable metallic resources in the production of advanced materials; hence, an effective recovery process is required to meet the rapidly increasing RE demand. In our previous study, we reported a unique peptide with RE recognition ability inspired by biomineralization[1)]. Here, we propose an artificial RE recovery approach that uses a functional silk displaying a RE-recognizing peptide[2)].

Using the *piggyBac* system, we constructed a transgenic silkworm in which the gene coding for the RE-recognizing peptide (Lamp1) was fused with that of the fibroin L (FibL) protein. The purified FibL-Lamp1 fusion protein from the transgenic silkworm was able to recognize RE ion under physiological conditions. Furthermore, the reusability of silk for RE recovery was confirmed by washing with a weak acidic solution. Our simple approach is expected to facilitate the direct recovery of RE from an actual mixed solution of metal ions, such as seawater and industrial wastewater, under mild conditions with low energy.

biomineralization, rare earth, silkworm

発表責任者：石田亘広（n-ishida@mosk.tytlabs.co.jp）

講演番号：3I05-10
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 11:00～ ミーティングルーム I

淡水性腐食環境に浸漬した様々な金属材料の腐食と微生物群集構造の解析

Comparative analysis of crrosion and attached microbial cells using various metal materials

○若井 暁[1]、宮永 一彦[2]、宮野 泰征[3]、砂場 敏行[4]、水上 裕貴[4]、江野 七海[4]、鹿嶋 賀実[5]、本間 一平[5]、渡邉 光司[5]、小林 将[5]、高井 研[1]([1]海洋機構超先鋭、[2]東工大生命理工、[3]秋田大理工、[4]INPEX・TRC、[5]INPEX・直江津 LNG)

○ Satoshi WAKAI[1], KAZUHIKO MIYANAGA[2], Yasuyuki MIYANO[3], Toshiyuki SUNABA[4], Hirotaka MIZUKAMI[4], Nanami ENO[4], Yoshimi KASHIMA[5], Ippei HOMMA[5], Koji WATANABE[5], Tasuku KOBAYASHI[5], Ken TAKAI[1] ([1]JAMSTEC, [2]Tokyo Tech., [3]Akita Univ., [4]INPEX TRC, [5]INPEX Naoetsu LNG)

微生物が金属材料の腐食に関与する現象は、微生物腐食として知られている。近年、金属鉄や普通鋼を実験室レベルで腐食可能な様々な腐食性微生物が報告され、腐食メカニズムが明らかにされつつある。一方で、耐食性材料であるステンレス鋼の腐食やその他の金属材料では微生物腐食の知見の蓄積は進んでいない。そこで、本研究では、以前にステンレス製の配管に微生物が影響したと思われる腐食が発生した環境を対象区として、様々な金属試験片（38 種類）の浸漬試験を実施し、付着微生物叢の解析を行った。1 カ月および 3 ヶ月後に、試験片を引き上げた結果、比較的腐食が進行しやすい炭素鋼や低クロム含量の鋼材は激しい腐食を示したが、各種ステンレス鋼には大きな腐食孔は認められなかった。微生物群集構造解析の結果、同じ環境に浸漬していたにもかかわらず、鋼材のタイプによって明らかに微生物群集構造が異なっていることを明らかにした。例えば、腐食が進行した鋼材の錆中には共通の微生物の集積が認めら、抗菌性が謳われている金属については、微生物の付着量が減少するだけでなく、微生物群集構造も大きく異なることが示された。同一環境においてこれほど多様な金属材料の浸漬試験を実施した例はこれまでになく、非常に示唆に富む結果が得られており、本研究成果は様々な金属材料が利用されている既存インフラの寿命予測等に重要な知見を与えるだろう。

Corrosion of stainless steel in fresh water environment have been sometime observed. Since stainless steel does not chemically corrode at such low chloride concentration, microbiologically influenced corrosion (MIC) has been suspected as cause of such corrosion. However, little is known about MIC of stainless steel and other metals. In this study, we attempted to reveal the corrosive influence of microorganisms for various types of metals. 38 kinds of metal pieces were immersed in to freshwater environment where corrosion of stainless steel has observed. After immersion for 1 and 3 months, each metal pieces were collected and microorganisms attached on the metal pieces were analyzed by meta16S sequencing. Carbon steel and low-Cr content steel were significantly corroded and enrichment of unique microorganisms were observed. Besides, in antibiotic metal materials, decreased attached cells and clearly different microbial communities were observed compared with those of stainless steel. Our findings would contribute to development of risk and life-time assessment for various metal materials.

metal, corrosion, biofilm

発表責任者：若井暁（wakais@jamstec.go.jp）

講演番号：3I05-11
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 11:00～ ミーティングルーム I

キトサンナノファイバーヒドロゲルを用いた米糠からのフィチン酸の迅速回収

Rapid recovery of phytic acid from rice bran using chitosan nanofiber-based porous hydrogels

○岩本 博行[1]、新田 祥子[2] ([1]福山大学生命工、[2]福山大学グリーンサイエンス研究センター)
○Hiroyuki IWAMOTO[1], Sachiko NITTA[2] ([1]Fukuyama Univ. LSB, [2]Fukuyama Univ. GSC)

【目的】フィチン酸（PA、イノシトール 6 リン酸）はキレート能が高く、鉄や亜鉛等と結合して腸管でのミネラル吸収を阻害する一方、抗酸化能を持ち、癌、糖尿病、腎結石などの疾患に効果を示すサプリメントとしても市販されている。PA は米糠や豆類の主要成分であり、米糠の約 6%を占める。本研究ではキトサンナノファイバーヒドロゲルを用いて、農業廃棄物である米糠からシンプルで低コストかつ有機溶媒を用いない PA の回収法を開発することを目的とした。
【方法】本実験で用いたヒドロゲルは、比表面積が大きく水中での分散性が良いウォータージェット製法のキトサンナノファイバー（スギノマシン社製）を、PEG で架橋したキトサンナノファイバーヒドロゲルを用いた。PA を低 pH でキトサンナノファイバーヒドロゲルに吸着させたあと遊離させ、得られた PA の純度を FT-IR や HPLC で確認した。
【結果】米糠を懸濁させた水溶液にヒドロゲルを浸漬して PA を吸着させたところ、キトサンナノファイバーハイドロゲルは多孔質で表面積が大きいため、吸着は 60 分以内に平衡化に達した。PA の吸着は、緩衝液の pH、温度、およびヒドロゲル中のキトサン含量に依存した。ヒドロゲルをアルカリ性溶液に浸漬することで PA を遊離させ、濃縮後エタノールで洗浄した。FT-IR および HPLC で確認した所、高純度のフィチン酸ナトリウムを収率 32.2-38.7%で得る事ができた。以上より、米糠から有機溶媒等を使用せずに高純度の PA を高収率で回収する方法が確立できた。

Phytic acid (PA) is a new type of naturally occurring pharmaceutical for afflictions such as cancer, diabetes, and renal calculi. The efficient, low-cost extraction of PA from biowaste is much sought-after. Herein, highly pure PA was obtained from rice bran by adsorption at low pH onto porous chitosan nanofiber hydrogels. Due to the large surface area of the chitosan nanofibers-based porous hydrogels, the adsorption equilibrated within 60 min. Adsorption of PA was influenced by the buffer pH, temperature, and the ratio of chitosan in the hydrogel. PA was recovered by soaking the hydrogel in alkaline solution. After concentrating the solution and washing the residue with ethanol, highly pure sodium phytate was obtained with 32.2–38.7% yield, as confirmed by FT-IR and HPLC. To our knowledge, this is the first report on the recovery of pure PA in high yield without using toxic solvents.

phytic acid, rice bran, chitosan nanofiber hydrogels

講演番号：3I05-12
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 11:00～ ミーティングルーム I

活性汚泥における高石灰化能を持つ微生物の探索と石灰化特性の分析

Analysis of calcification property of bacteria identified from the activated sludge

○吉國 由希久[1]、鈴木 道生[1,2] ([1]東大院農、[2]東大　微生物連携機構)
○Yukihisa YOSHIKUNI[1], Michio SUZUKI[1,2] ([1]UTokyo, [2]CRIIM,　UTokyo)

食料生産に直接関わるリン肥料は天然資源であるリン鉱石を原料とするが、リン鉱石は 100 年以内に枯渇すると試算される。従って廃棄物からのリン回収の推進が必要で、多くのリンを蓄えた有望な廃棄物として活性汚泥と呼ばれる下水汚泥がある。活性汚泥の組成は微生物を主とし、リンを豊富に含んでいる。既存の活性汚泥からのリン回収技術は、活性汚泥が蓄えたリンを抽出して溶液からリンを回収する方法、または汚泥焼却灰からリンを抽出する方法が主である。しかしこれらの技術は普及しておらず、採算性が課題である。現在、活性汚泥の多くは焼却の後に埋め立てられるか建築資材に用いられる。

さて、歯石は歯垢と呼ばれるバイオフィルムが石灰化したものとされ、微生物の石灰化現象として広く知られている。我々は歯石から着想を得て、歯石形成を模すことによって活性汚泥を石灰化できないかと考えた。生体内に濃縮されたリンを拡散させることなく不溶性のリン酸カルシウムへと固定できれば、エネルギーの無駄が少なく安価かつ環境に優しい技術になる。本研究においては、活性汚泥の石灰化への足掛かりとして、活性汚泥から高い石灰化能を持つ微生物を単離し、その石灰化特性を明らかにすることを目的とした。

活性汚泥から単離した微生物を歯石形成の研究において用いられる石灰化液に漬け、振盪後上清の Ca 濃度を ICP-MS で測定することにより高石灰化株の探索を行った。振盪後上清の Ca 濃度が再現良く低い Ka16 株を選別し、電子顕微鏡とエネルギー分散型 X 線分析装置を用いて石灰化物の分析を行った。その結果、各々の菌体が石灰化していることに加え、粒径の揃った数マイクロメートルの球状リン酸カルシウム粒子が多数生成していることが分かった。このことから、球状リン酸カルシウムの生成を促進し、更に自身の石灰化を誘発する機構を Ka16 株が備えていると考えられる。現在、SDS-PAGE や HPLC-ICP-MS を用いてリン酸カルシウム形成に関与する分子を同定しようと試みている。

Recycling phosphorus is important because rock phosphate as natural resources run out. Especially, activated sludge is hopeful waste but most of them were not recycled. We suggest that calcification of activated sludge as a new method. Isolated bacteria from activated sludge were soaked in calcification solution and calcification ability were evaluated by Ca concentration in supernatant. Ka16 strain was selected by low Ca concentration in supernatant and good reproducibility. Analysis of calcification was performed by SEM and EDS. As a result, microbial cells were calcified, and there were many uniform spherical calcium phosphate particles of a few micrometer. Now, we are trying to identify the molecular involved in calcification by SDS-PAGE and HPLC-ICP-MS.

activated sludge, biomineralization, calcium phosphate

発表責任者：鈴木道生（amichiwo@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3I05-13
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 11:00～ ミーティングルーム I

バイオデバイス構築のための 直接電子移動型酸化還元酵素の創製

Creation of direct electron transfer oxidoreductase for biodevice construction

○加藤 真海、髙村 映一郎、坂元 博昭、里村 武範、末 信一朗（福井大学）
○Masami Kato, Eiichiro Takamura, Hiroaki Sakamoto, Takenori Satomura, Shin-ichiro Suye (Fukui Univ.)

バイオ電池（BFC）は生体内の物質を利用し発電することが可能であることから医療用体内埋め込み型デバイス（IMD)の電源として注目されている。IMD 用電源としてバイオ電池を用いるためには、長期間安定した作動と遊離のメディエータが不要なシステムが望まれる。そのためには安定性が高く、直接電子移動（DET）型酵素が必要となるが DET 型酵素は限られている。さらに電池出力の向上のためには酵素分子の電極上への配向制御も電子伝達効率の向上に重要である。そこで、本研究では、電極上へ酵素分子の配向を制御した状態で酵素電極間の電子伝達向上に寄与する部位に電子移動を仲介する低分子酸化還元物質（メディエータ）を修飾した効率の良い電子伝達系の設計を目指した。

長期安定性を有する超高熱性アーキア *Pyrobaculum aerophilum* 由来の PQQ-GDH を用いて、酵素分子表面のリシン残基のアミノ基に反応するメディエータ（Amine reactive PES）を使用しメディエータを修飾しこれを、酵素分子末端の His-tag と Ni 原子を介して MWCNT 修飾電極上に配向固定した。この電極の CV 測定を行ったところ、基質であるグルコースを添加することで酸化波の増大が確認された。したがって、酵素表面に修飾した PES を経由したグルコースの酸化還元反応による酵素 - 電極間の電子移動が起きていることが明らかになった。

Biofuel cells (BFCs) are expected to be a new energy source for implantable medical devices because of their ability to generate electricity from biosubstances in body. But it is requred to increase the output for practical use. Enzymes used in BFCs for IMD energy source are preferably direct electron transfer (DET) type enzymes, which are capable of direct electron transfer. However, DET type enzymes are rare and difficult to find out from nature. It is also important to improve the efficiency of electron transfer between and enzyme electrodes in order to increase the power density of BFCs. We tried to prepare quasi -DET type enzyme using ArPES (Amine-reactive PES). PQQ-GDH from hyperthermophilic Archaea, which has excellent long-term stability was immobilized orientedly on the surface of MWCNT using affinity Ni^{+} and His-tag of the enzyme. PES was modified on the enzyme surface Finally, this complex is immobilized on the GC electrode and I evaluated electrochemical properties by CV measurement.

Biofuel cell, Electron transfer, Bioanode

講演番号：3I05-14
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 11:00～ ミーティングルーム I

NAD^+ -カーボンナノチューブを用いたマルチエンザイム型バイオ電池の開発

Construction of multi-enzymatic biofuel cells combined with NAD^+-carbon nanotube complex

○木村 美智子[1]、高村 映一郎[1]、坂元 博昭[1]、里村 武範[2,3]、櫻庭 春彦[4]、大島 敏久[5]、末 信一朗[1,2,3] ([1]福井大学院・工・繊維、[2]福井大学・ライフセ、[3]福井大学院・工・生物応用化、[4]香川大農、[5]大阪工大)

○Michiko KIMURA[1], Eiichiro TAKAMURA[1], Hiroaki SAKAMOTO[1], Takenori SATOMURA[2,3], Haruhiko SAKURABA[4], Toshihisa OHSHIMA[5], Shin-ichiro SUYE[1,2,3] ([1]Dept. Front. Fib., Grand. Sch. Eng., Univ. Fukui, [2]Res. Edu. Prog. Life Sci., Univ. Fukui, [3]Dept. Appl. Chem. Biotechnol., Grand. Sch. Eng., Univ. Fukui, [4]Kagawa Univ., [5]Osaka Inst. Tech.)

バイオ電池（BFC）は、生体反応に基づく酸化還元反応によって有機物から電気エネルギーを得る装置である。BFC は、一般的な燃料電池と比較して、安全かつ環境負荷が小さいという利点があるが、多くの BFC は、グルコースを基質として用いており、グルコースの食糧との競合や、電池出力の低さが問題として挙げられる。そこで本研究では、食品廃棄物の主成分である L-プロリンを開始基質とし、好熱菌由来の 4 種類の酵素を用いた多段階酵素反応を用いて、基質 1 分子から 6 電子抽出することにより電池の高出力化を目指した。本反応系では、NADH とメディエーターを介して電極との電子伝達を行う。

本研究では、高い比表面積と優れた導電性を有するカーボンナノチューブ（CNT）を用いて補酵素である NAD^+およびメディエーターであるフェロセン（Fc）を反応場に固定化した電極を作製した。作製した電極についてサイクリックボルタンメトリー（CV）測定を行った結果、基質存在下において、基質の酸化による電流値の増大が確認された。以上から、電極表面に NAD^+, Fc 固定化されており、固定化された NAD^+を介した酵素電気化学反応が進行したことが示唆される。

The biofuel cell (BFC) is a device that extracts electric energy from organic substance by a redox reaction based on the biological reaction. BFC has advantages of being safe and eco-friendly comparison with a conventional fuel cell. However, many BFC uses glucose as a substrate, which causes competition with glucose food and low battery output. In this study, we aimed to increase the battery output by extracting six electrons from a single substrate L-proline, a major component of food waste, using a multi-step enzymatic reaction with four enzymes derived from thermophilic archaea. In this system, electron transfer to the electrode via NADH and mediators.

In this study, carbon nanotubes (CNTs) with high specific surface area and excellent conductivity were used to fabricate electrodes in which the cofactor NAD^+ and the mediator ferrocene (Fc) were immobilized. In cyclic voltammetry (CV), an increase in the current value due to substrate oxidation was observed in the presence of the substrate. These results suggest that NAD^+ and Fc were immobilized on the surface of the electrode and that the electrochemical enzymatic reaction via the immobilized NAD^+ occurred.

biofuel cell, carbon nanotube, NAD^+

発表責任者：木村美智子（kimuram@biofiber-fukui.com）

講演番号：3I05-15
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 11:00～ ミーティングルーム I

好熱菌酵素を素子としたアミノ酸駆動型高耐久性バイオ電池の開発

Development of amino acid powered biofuel cells with long-life using thermophilic enzyme

○里村 武範[1,2]、堀永 晃作[1]、高村 映一郎[1]、坂元 博昭[1]、大島 敏久[3]、櫻庭 春彦[4]、末 信一朗[1] ([1]福井大工、[2]福井大ライフ、[3]大阪工大工、[4]香川大農)
○ Takenori SATOMURA[1,2], Kousaku HORINAGA[1], Eiichirou TAKAMURA[1], Hiroaki SAKAMOTO[1], Toshihisa OHSHIMA[3], Haruhiko SAURABA[4], Shin-ichiro SUYE[1] ([1]Fukui Univ., [2]Life Univ. Fukui, [3]Osaka Inst. Tech., [4]Kagawa Univ.)

バイオ電池は、酸化還元酵素を素子として、血中や体外分泌液中の生体分子が持つ化学エネルギーを電気エネルギーに変換する事ができるデバイスである。バイオ電池は生体内埋込み型医療機器用電源として注目されているが、酵素の安定性、低活性に起因する電池の長期安定性や低出力という課題を抱えている。そこで、本研究では高い安定性を有する好熱菌由来酵素を電極用素子としたバイオ電池を開発し長期間駆動可能なバイオ電池の開発に成功した。しかしながら、好熱菌由来酵素を素子としたバイオ電池では低電池出力の課題の解決には至っていない。そこで、複数の脱水素酵素を組み合わせ、一分子の基質を多段階酸化する人工の酸化反応経路を設計し電池出力向上を目指した長期間連続駆動可能なバイオ電池の開発を行った。

The biofuel cell (BFC) is a bioelectrochemical device that converts the chemical energy of biomolecules into electrical energy using oxidoreductase as a biocatalyst. BFC shows great potential as a power source for implantable medical devices because of its reduced toxicity than other traditional batteries. However, the practical applications of BFCs remain limited due to their short battery life caused by enzyme instability. Most enzymes used as biocatalysts for BFC so far have been enzymes prepared from mesophilic organisms. Mesophilic enzymes are not always stable under in vitro conditions. Enzymes from thermophiles have been known to be much more stable at room-temperature and across a wider pH range than those from mesophiles.
We have successfully constructed BFC using L-proline oxidation with thermostable dye-linked L-proline dehydrogenase have a longer battery life1. However, although the L-proline powered BFC showed stable operation, its power density was not sufficient for practical applications. In this study, we constructed a BFC using a novel artificial synthetic pathway to achieve the multi-step oxidation of L-proline to improve the low power density of the L-proline powered BFC.

Biofuel cell, Dye-linked dehydrogenase, Thermophile

発表責任者：里村武範（satomura@u-fukui.ac.jp）

講演番号：3I05-16
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 11:00～ ミーティングルーム I

水田土壌細菌叢の NGS 解析と発電菌の同定

Analysis of microbiome in paddy soil by NGS and identification of nanowire bacteria

○田丸 浩[2,3,4]、林 真由[1]、岡崎 文美[2,3,4] ([1]三重大生資、[2]三重大院生資、[3]三重大・バイオインフォ、[4]三重大・スマートセルイノベ研セ)
○Yutaka Tamaru[2,3,4], Mayu Hayashi[1], Fumiyoshi Okazaki[2,3,4] ([1]Facult. Bioresour., Mie Univ., [2]Grad. Sch. Bioresour., Mie Univ., [3]Mie Univ. Bioinfo., [4]Mie Univ. SCIC)

水田土壌の窒素肥沃度は微生物による窒素固定が支えているため、窒素固定反応を含むさまざまな窒素循環や炭素循環に関与する細菌群の包括的・総合的な一斉評価は非常に興味深い。一方、水田土壌中にはメタン生成菌が潜んでいて、稲わらなどの有機物をエサにメタンを発生させる。水田から発生するメタンは意外に多く、日本国内の人間活動により排出されるメタンの 45%が稲作によって出されるものです。そのため、水田で発生するメタンを少しでも減らしていければ地球温暖化の抑制に効果があります。本研究では、水田土壌をサンプリングして次世代シークエンサーによる菌叢解析を行った。16S rRNA の V1-V2 領域をターゲットとした 1 回目の PCR を行い、さらにインデクス PCR 用キットを用いて 2 回目の PCR を行った。得られた PCR サンプルを次世代シークエンサーに供与して菌叢解析を行った。その結果、Clostridiales や Rhizobiales、Syntrophobacterales など土壌中に存在する代表的な細菌が検出された。さらに、興味深いことに、セルロソーム生産菌 *Clostridium cellulovorans* および発電菌 *Geobactor* 属細菌なども同定された。

Since nitrogen fixation by microorganisms supports nitrogen fertility in paddy soil, comprehensive simultaneous evaluation of various bacterial groups involved in the nitrogen and carbon cycles, including nitrogen fixation reactions, is very interesting. On the other hand, methanogens are lurking in the soil of paddy fields, and organic matter such as rice straw is used as food to generate methane. The amount of methane generated from paddy fields is surprisingly large, and 45% of the methane emitted by human activities in Japan is produced by rice cultivation. Therefore, reducing the amount of methane generated in paddy fields will be effective in curbing global warming. In this study, paddy soil was sampled and bacterial flora was analyzed by a next-generation sequencer (NGS). The first PCR was performed targeting the V1-V2 region of 16S rRNA, and the second PCR was further performed using the index PCR kit. The obtained PCR sample was donated to a NGS for bacterial flora analysis. As a result, typical bacteria existing in soil such as Clostridiales, Rhizobiales, and Syntrophobacterales were detected. Interestingly, the cellulosome-producing bacterium *Clostridium cellulovorans* and the power-generating bacterium Geobacter were also identified.

nanowire bacteria, Clostridium cellulovorans, Next Generation Sequencing

発表責任者：田丸　浩（ytamaru@bio.mie-u.ac.jp）

講演番号：3I05-17
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 11:00～ ミーティングルーム I

効率的な多段階酵素反応系を目指した DNA の相補性を利用した酵素・メディエータ共固定化電極の構築

Co-immobilization of enzyme and mediator using DNA as platform of immobilization for multienzyme system

○高村 映一郎、熊谷 玄太、坂元 博昭、里村 武範、末 信一朗 (福井大学)
○Eiichiro Takamura, Genta Kumagai, Hiroaki Sakamoto, Takenori Satomura, Shin-ichiro Suye (University of Fukui)

バイオ電池（BFC）は温和な条件で作動可能であり、糖やアルコールなどの再生可能燃料を用いるといった利点がある。しかし、現在の BFC は出力密度が低く、寿命も短いため、実用化には BFC のさらなる高出力・長寿命化が必要である。近年のバイオ電池の研究では複数の酵素の触媒反応によって進行する化学反応系（多段階酵素反応系）が注目されている。この系では基質 1 分子あたりからより多くの電子を取り出すことが可能であり、エネルギー効率が高い。電極上で多段階酵素反応が起こる場合、酵素が順序良く並ぶことで出発物質から最終生成物への反応が効率よく進むと考えられる。しかし、系の構築には複数の酵素、電子伝達メディエータ、補因子が必要であり、これらを任意の配列で電極上に固定化することは困難であった。そこで、本研究では DNA の相補性に着目した。電極上へ鋳型 1 本鎖 DNA を固定化し、鋳型 DNA の各配列に相補的な配列を有し、さらに各要素を修飾した DNA 断片を特異的に結合させる。これによって、電極上へ多段階酵素反応に必要な要素を順序良く配置することで、多段階酵素反応系におけるエネルギー効率の向上を目指す。本発表では DNA を用いたメディエータと酵素の共固定化について報告する。

金電極表面に末端チオール修飾鋳型 1 本鎖 DNA（DNA-T）を Au-S 結合により固定化し、チオール反応性メディエータ（PES）を修飾した短 1 本鎖 DNA を DNA-T にハイブリダイゼーションさせた。続いて、*Aeropyrum pernix* 由来色素依存性 L-プロリン脱水素酵素を修飾した短 1 本鎖 DNA を DNA-T にハイブリダイゼーションさせることで酵素・メディエータ共固定化電極を作製した。作製した電極を作用極、白金を対極、銀塩化銀を参照極とした三電極方式で基質である L-プロリンを含む電解液でサイクリックボルタンメトリーを行った結果、基質の添加によって酸化電流の増大が確認されたことから DNA を介して酵素・メディエータの共固定化が達成できたと考えられる。

Biofuel cells (BFCs) can operate under mild conditions and has the advantage of using renewable fuels such as sugar and alcohol. We are aiming to construct a BFC using multienzyme system to improve the energy density. DNA complementarity was used to construct an efficient multienzyme system. This study focuses on the co-immobilization of enzymes and mediators. The enzyme and mediator were co-immobilized by hybridizing the mediator-modified DNA and the enzyme-modified DNA to the template DNA. The prepared electrodes were evaluated by cyclic voltammetry. The oxidation current of prepared electrode increased with the addition of the substrate.

biofuel cell, bioanode, co-immobilization

発表責任者：高村映一郎（e_takamr@u-fukui.ac.jp）

講演番号：3I06-01
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:00～ ミーティングルーム I

複数酵素におけるヒト GlcNAc-1-P 転移酵素との物理的相互作用に必須な領域の限定

Refinement of the regions on several enzymes which are essential for the physical interactions with the human GlcNAc-1-P transferase

○高橋 哲夫、大城 理樹 (東海大工生命化学)
○Tetsuo TAKAHASHI, Riki OSHIRO (Tokai Univ.)

ヒト *N*-アセチルグルコサミン-1-リン酸転移酵素(hGPT)は、ドリコール中間体(DLO)生合成経路において第 1 段階に働く。我々は、酵母 split-ubiquitin システムを用いて、本酵素が同経路で働くヒトドリコールキナーゼ(hDK)、ヒト GlcNAc 転移酵素複合体の膜貫通サブユニット(hAlg14)及びヒトドリコールリン酸マンノース合成酵素複合体(hDPMS)の 2 種類の膜貫通サブユニット(hDPM2 及び hDPM3)と物理的に相互作用することを見出した。さらに我々は、同経路のドリコールピロリン酸ホスファターゼ(hDPP)との相互作用も見出している。そこで本研究では、これら複数の相手酵素において hGPT との相互作用に重要な領域を限定することにした。hGPT と相互作用する hDPM3 に関して、N 末端から第 2 疎水性領域(HR2)あるいは第 2 ループ領域(LR2)までを発現する欠失プレイコンストラクト pPR-N-hDPM3HR2 及び pPR-N-hDPM3LR2 をそれぞれ作成した。これらを hGPT の全長ベイトコンストラクト pBT-N-hGPT と組み合わせて酵母 NMY51 株を形質転換し、得られたベイト/プレイ共発現株についてレポーター検出培地上での増殖性を試験することで、相互作用の維持または消失を検討した。その結果、pBT-N-hGPT/pPR-N-hDPM3HR2 共発現株では増殖性が観察されたが、pBT-N-hGPT/pPR-N-hDPM3LR2 共発現株では増殖性が見られなかった。これらの結果から、hGPT との相互作用に重要な hDPM3 側の領域は HR2 であることが示唆された。現在同様な欠失コンストラクトを用いた解析を行い、hDPM2、hDK、hAlg14 及び hDPP について、hGPT との相互作用に重要な領域の同定を進めている。

The human N-acetylglucosamine-1-P transferase (hGPT) is involved in the first step of dolichol-linked oligosaccharide (DLO) assembly. Using the yeast split-ubiquitin system, we found that the enzyme physically interacts with the human dolichol kinase (hDK), hAlgh14 subunit of the human GlcNAc transferase, hDPM2 and hDPM3 subunits of the human dolichol-P-mannose synthase (hDPMS). We also found its interaction with the human dolichol-pyrophosphate phosphatase (hDPP). Hence we tried to refine the regions in these enzymes, which are critical for the interaction with hGPT. For this purpose, we prepared deletion versions of the bait/prey constructs of these enzymes for analyses with the yeast split-ubiquitin system. As for the hDPM3, we have obtained the data that indicates the second hydrophobic region (HR2) of hDPM3 is essential for the interaction with the hGPT. The results on the other enzymes will be also presented and discussed in this lecture.

GPT, physical interaction, split-ubiquitin system

講演番号：3I06-02
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:00～ ミーティングルーム I

酵母 split-ubiquitin システムを用いたヒト DPMS とヒト PIG-M 間の物理的相互作用の解析

Analyses on the physical interactions between the human DPMS and human PIG-M using the yeast split-ubiquitin system

○後藤 菜々美、大城 理樹、高橋 哲夫 (東海大工生命化学)
○Nanami GOTO, Riki OSHIRO, Tetsuo TAKAHASHI (Tokai Univ.)

ヒト・ドリコールリン酸マンノース合成酵素(hDPMS)は、ドリコール中間体(DLO)、GPI アンカー及び *O*-マンノース結合型糖鎖の生合成に必要なドリコールリン酸マンノース(DPM)を産生している。最近我々は、酵母 split-ubiquitin システムを利用した解析により、hDPMS の 2 つの膜貫通サブユニット hDPM2 及び hDPM3 が、GPI アンカー生合成経路で最初のマンノース付加に働くヒト α1,4-マンノース転移酵素 hGPI-MT-I の触媒サブユニット hPIG-M と相互作用することを見出した。そこで本研究では hDPMS と hPIG-M 間の相互作用に必要な領域について詳細に解析することにした。

hPIG-M に関する酵母 split-ubiquitin システム用の 2 種類のベイト発現コンストラクト(pBT-N-hPIG-M, pBT-C-hPIG-M)を、hDPM2 及び hDPM3 に関するプレイ発現コンストラクト(pPR-N-hDPM2, pPR-C-hDPM2, pPR-N-DPM3, pPR-C-DPM3)と組み合わせて酵母 NMY51 株を二重形質転換し、得られたベイト/プレイ共発現株について、レポーター遺伝子(*HIS3, ADE2*)発現検出用の 2 種類の選択培地(SD-LWH 及び SD-LWHA)上で増殖性を観察した。その結果、hPIG-M の C 末端側のみが hDPM2 及び hDPM3 の N 末端側と特異的に相互作用することが判明した。そこで、2 回膜貫通型である hDPM2 及び hDPM3 それぞれの、N 末端から第 2 膜貫通領域(HR2)までを残し第 3 ループ領域(LR3)を欠失した変異体を発現する pPR-N-hDPM2HR2 及び pPR-N-hDPM3HR2 と、N 末端から第 2 ループ領域(LR2)までを残し HR2 と LR3 を欠失した pPR-N-hDPM2LR2 及び pPR-N-hDPM3LR2 を作成した。現在、これらの欠失変異 hDPM2 及び hDPM3 のプレイ発現コンストラクトと全長 hPIG-M ベイト発現コンストラクトを用いた物理的相互作用の有無を当システムで検証中であり、その結果を報告する予定である。

The human dolichol-P-mannose synthase (hDPMS) serves as supplier of substrate for several enzymes involved in biosynthesis of dolichol-linked oligosaccharide (DLO), GPI-anchor and *O*-mannose type glycan. Using the yeast split-ubiquitin system, we recently found that the hDPM2 and hDPM3 subunits of hDPMS physically interact with the hPIG-M subunit of the first human mannosyltransferase in GPI-anchor assembly (hGPI-MT-I). Therefore we tried to further analyze the interactions between the hDPMS subunits and hPIG-M. For this purpose, we prepared deletion version of the bait/prey constructs of hDPM2 and hDPM3 for analyses by the yeast split-ubiquitin system. The results with these deletion constructs will be presented and discussed in this lecture.

DPMS, PIG-M, physical interaction

講演番号：3I06-03
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:00～ ミーティングルーム I

Sphingobacterium 属細菌由来新奇シアル酸ピルビン酸リアーゼ (SPL)の酵素学的性質の解析
Enzymatic properties of novel sialate-pyruvate lyase (SPL) from *Sphingobacterium* sp.
○中川 貴博[1,2]、岩木 佑弥[1,2]、呉 迪[1,2,3]、羽根 正弥[1,2,3]、佐藤 ちひろ[1,2,3]、北島 健[1,2,3] ([1]名大・生物機能セ、[2]名大院・生命農、[3]糖鎖生命コア研究拠点・名大)
○Takahiro NAKAGAWA[1,2], Yuya IWAKI[1,2], Di WU[1,2,3], Masaya HANE[1,2,3], Chihiro SATO[1,2,3], Ken KITAJIMA[1,2,3] ([1]Biosci. Biotech. Center., Nagoya Univ., [2]Grad. Sch. Bioagr. Sci. Nagoya Univ., [3]iGCORE, Nagoya Univ.)

シアル酸は糖鎖の非還元末端に存在する酸性 9 炭糖で、5 位の置換基の違いから、*N*-アセチルノイラミン酸 (Neu5Ac)、*N*-グリコリルノイラミン酸 (Neu5Gc)、デアミノノイラミン酸 (Kdn)に分けられる。これらのシアル酸は、自然界において広く分布している。例えば、原核生物では、グラム陰性細菌に Neu5Ac が存在する。一方で、真核生物では、脊椎動物、原索動物、棘皮動物および原生生物にシアル酸が存在することが知られている。加えて、一部の節足動物および軟体動物においてもシアル酸の存在は報告されている。

真核生物および一部の原核生物では、これらのシアル酸を分解する酵素であるシアル酸ピルビン酸リアーゼ (SPL)をもっている。この酵素は Neu5Ac を *N*-アセチルマンノサミン (ManNAc)とピルビン酸に、Kdn をマンノースとピルビン酸に分解する反応を触媒する。一般的に、SPL は天然に最も多く存在する Neu5Ac を主に分解することが知られている。

本研究では、土壌中の *Sphingobacterium* 属細菌から、Kdn をより好んで分解する SPL を見出し、その酵素学的性質を明らかにした。具体的には、至適 pH が 7-8 付近に存在すること、至適温度が 50 ℃付近に存在すること、塩濃度依存的に活性が低下することを明らかにした。また、大腸菌由来の SPL との比較から推定された基質特異性に関わると考えられるアミノ酸を変異させた変異体についても解析を行った。Kdn を優先的に分解する SPL が見出されたことから、自然界におけるシアル酸として Neu5Ac だけでなく Kdn の代謝の重要性が示唆される。

Sialic acid (Sia) is a group of acidic sugars with nine carbon backbone. Sia consists of three types of fundamental species whose substituted group at C5 position is different. Neu5Ac and Neu5Gc have an acylamide group, while Kdn has a hydroxyl group. Sias are found in gram-negative bacteria, echinoderms, protochordates and vertebrates. Free Sias are cleaved into pyruvate and C6-conpounds by the lytic enzyme SPL. In this study, we found that, although SPL usually uses Neu5Ac, SPL from *Sphingobacterium* sp. that was isolated from a soil preferred Kdn to Neu5Ac. We also investigated its enzymatic properties. In addition, effects of mutations on the amino acid residues that were related to the substrate specificity were also analyzed. The discovery of the existence of Kdn-specific enzyme indicates the metabolic significance of Kdn as well as Neu5Ac in nature.

sialic acid metabolism, Sphingobacterium, deaminoneuraminic acid

講演番号：3I06-04
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:00～ ミーティングルーム I

Prevotella melaninogenica の産生する宿主糖タンパク質糖鎖遊離酵素の立体構造解析

Three-dimensional structure analysis of endo-β- *N*-acetylglucosaminidase PM responsible for deglycosylation of host glycoproteins in *Prevotella melaninogenica*

大倉 和貴、森 真司、神谷 信夫、宮原 郁子、○伊藤 和央 (阪市大・院理)
Kazuki OKURA, Shinji Mori, Nobuo KAMIYA, Ikuko MIYAHARA, ○Kazuo ITO (Grad. Sch. of Sci., Osaka City Univ.)

我々は、Native な糖タンパク質からアスパラギン結合型糖鎖を遊離するエンド-β-*N*-アセチルグルコサミニダーゼ産生菌の探索、機能・構造解析と開発を行っている。これまでに得た *Prevotella* 属菌の酵素は菌体結合型で、アスパラギン結合コンプレックス型糖鎖を Native 糖タンパク質から遊離し、糖鎖転移活性を示す。本研究では、*P. melaninogenica* が産生するエンド PM のアイソザイム、エンド PMα の立体構造解明のために、遺伝子組換えエンド PMα(r エンド PMα)の X 線結晶構造解析を行った。

その結果、r エンド PMα の板状単結晶が得られ、PF BL-17A において分解能 2.1Å の X 線回折データを収集した。N 末端側の膜貫通領域を除く 28~1008 残基を含む立体構造モデルを構築し、最終的な R_{work}/R_{free} は 0.190/0.235 となった。r エンド PMα には 5 つのドメインが存在し、N 末端側からドメイン I~V とした。ドメイン I は GHF85 酵素に保存される TIM バレルで、触媒部位と考えられている Asn、Glu および Tyr 残基が存在し、触媒ドメインと考えられた。ドメイン II～V は互いに異なる β バレルで、ドメイン II と III は GHF85 酵素に存在した。ドメイン IV と V は r エンド PMα に特有で、ドメイン IV の構成領域は酵素活性に必要で、エンド PMα の糖鎖認識に関与しているものと考えられた。ドメイン V は外膜ソーティングモチーフで構成され、エンド PMα の外膜への移行ドメインと考えられた。

We investigate the screening of endo-β-*N*-acetylglucosaminidases releasing *N*-glycans from native glycoproteins, the structure/function and their application. The enzymes from genus *Prevotella* isolated so far are cell-bound, release and transfer complex type of *N*-glycans. In this research, three-dimensional structure of Endo PMα, an isozyme of Endo PM from *P. melaninogenica* was analyzed by X-ray crystallography.

Plate-like single-crystal of functionally expressed rEndo PMα was prepared. X-ray diffraction data were obtained with 2.1Åresolution at PF BL-17A. 3D structure model of rEndo PMα of 28~1008 amino acid residues lacking TM region at N-terminal was constructed with R_{work}/R_{free} = 0.190/0.235. rEndo PMα consisted of 5 domains numbered I~V from N-terminal. Domain I was TIM barrel conserved in GHF 85 enzymes. Proposed catalytic residues, Asn, Glu and Tyr existed in domain I, indicating domain I is the catalytic domain. Domain II~V were βbarrel of different structures. Domain II and III were present in GHF 85 enzymes. Domain IV and V were characteristic of rEndo PMα. Domain IV consisted of the region required for activity, suggesting domain IV is for *N*-glycan recognition. Domain V consisted of the motif for protein sorting to outer membrane, indicating domain V is the sorting domain of Endo PMα to the outer membrane of *P. melaninogenica*.

Prevotella melaninogenica, endo-β-*N*-acetylglucosaminidase PM, three-dimensional structure

講演番号：3I06-05
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:00～ ミーティングルーム I

Sialylation plays critical roles in embryogenesis in medaka

○Di Wu[1,2,3], Akiko Fujita[1], Hisashi Hashimoto[4], Masahiko Hibi[4], Yoshihito Taniguchi[5], Yasuhiro Kamei[6], Chihiro Sato[1,2,3], Ken Kitajima[1,2,3] ([1]Biosci. Biotech. Center, [2]Grad. Sch. Bioagr. Sci., [3]Institute for Glyco-core Research (iGCORE), Nagoya Univ., [4]Grad. Sch. Sci., Nagoya Univ., [5]Kyorin Univ. Sch. Med., [6]Nat. Inst. Basic Biol.)

Sialic acid (Sia) residues are expressed on glycan chains of vertebrate glycoproteins and glycolipids in a developmental stage-specific and an organ-specific manner. It has been reported that impairments of Sia biosynthesis lead to many human diseases. For example, a homozygous mutation in CSS was recently reported to cause autosomal recessive intellectual disability in human, thus indicating that CSS plays important roles in neural system [Qu *et al*. 2019]. However, how the underlying mechanisms of these human diseases are related to the changes of Sia metabolisms is still mysterious. The CMP-Sia synthetase (CSS) is prerequisite for the expression of Sia-glycoconjugates, because free Sia can be transferred to the terminus of glycan chains of glycoproteins and glycolipids only after activated to CMP-Sia by CSS. To understand the biological significance of CSS and Sia at the animal level, we have generated CSS-deficient medaka by transcription activator-like effector nucleases (TALENs) method.

First, the CSS expression and sialylation levels in early developmental stage of medaka fish were quantified by real-time PCR and the lectin-staining, respectively. Next, the kinetic analysis was done with the purified recombinant medaka CSS expressed in *E. coli*. Like other vertebrate CSSs, medaka CSS consists of the N-terminal catalytic domain and the C-terminal domains, and prefers Neu5Ac as a substrate. Furthermore, CSS-null medaka was established by TALEN method by targeting on exon 1 of medaka CSS gene. Finally, the medaka fish containing a 15 bp-insertion in exon 1 of CSS gene was established and shown to be the CSS-null fish. According to the survival curve, the CSS-null medaka could not survive beyond two months. Biochemically, the reduction of the polySia epitope and the amount of bound Sia was observed in CSS-null medaka. Histological and immunohistochemical studies showed that cell density of neural tissues became higher in CSS-null medaka, probably due to the reduction of sialylation including polySia synthesis in neural cells. In addition, the isoforms of myosin heavy chain, a marker for myogenesis, was reduced in CSS-null compared with wild-type medaka, suggesting that sialylation is also related to myogenesis in medaka. These results suggested the essential roles of CSS and sialylation in early development of medaka.

sialic acid metabolism, CMP-Sialic acid synthetase, medaka

講演番号：3I06-06
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:00～ ミーティングルーム I

タンパク質の可溶化メカニズムの解明に向けた含意関係に基づく新たなデータ分析技法の開発

Development of a novel data analysis technique based on implications toward elucidation of protein solubility

○榊原 一紀、尾崎 裕樹、中村 正樹、篠田 優、浅野 泰久（富山県立大学）
○ Kazutoshi Sakakibara, Yuki Ozaki, Masaki Nakamura, Suguru Shinoda, Yasuhisa Asano (Toyama Prefectural University)

アミノ酸の配列はタンパク質の立体構造や性質を決定する重要な要素の一つである．一例として，タンパク質を構成するアミノ酸残基を変異することにより，機能を損なうことなく可溶性発現を改善する可能性があることが示されている[1]．しかし，タンパク質の性質や機能を改良するための変異部位の特定は困難であり，それらの効率的な予測には変異導入によってタンパク質の諸性質が向上するメカニズムの解明が課題となる．本研究の目的は，上記の課題に対して，形式概念分析と呼ばれるデータ分析手法を適用し，アミノ酸配列情報やタンパク質の諸性質と可溶性発現との関係を計算機支援のもとで分析する手法を検討することである．形式概念分析は統計の考え方とは異なり，対象において必ず成立する特徴を含意関係として抽出する．

本研究では，ターゲットタンパク研究プログラムで構築された eSOL データベース (http://www.tanpaku.org/tp-esol/)を用いて，そこに含まれる「試験管内タンパク質合成系を用いて発現させた際の凝集の度合い（可溶率）」とタンパク質の諸性質やアミノ酸配列情報を対象に形式概念分析を行った．形式概念分析によって得られた含意関係を分析した結果，各タンパク質の「凝集の度合い（可溶率）」と「アミノ酸配列の N 末端付近のアミノ酸の性質（Lehninger によるアミノ酸の分類[2]）」との関係性が見られた．

Recombinant gene expression is one of the key technologies to achieve large-scale production of enzymes. However low protein solubility prevents its advantage. Asano et al have created several highly active and *in vivo* soluble mutants by directed evolution and successful structure-guided mutagenesis[1]. In order to facilitate the *in vivo* experiments for searching soluble mutants, we newly introduce an analysis methodology which extracts information about the relationship between solubility and various biochemical attributes of enzymes.

[1] D. Matsui *et. al.*, *Sci. Rep.*, 7, 9558 (2017)
[2] Lehninger, A. L., Nelson, D. L., & Cox. M. M., *Principles of Biochemistry* (2nd ed.). New York, NY: Worth Publishers (1993).

formal concept analysis, protein, solubility

発表責任者：榊原一紀（sakakibara@pu-toyama.ac.jp）

講演番号：3I06-07
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:00～ ミーティングルーム I

網羅的変異スキャンによる転写制御因子 XylS のリガンド特異性の改変

Engineering of the ligand specificity of the transcriptional regulator XylS by deep mutational scanning

○小川 友希[1]、勝山 陽平[1,2]、大西 康夫[1,2]（[1]東大院・農生科・応生工、[2]東大・微生物イノベ連携機構）
○Yuki OGAWA[1], Yohei KATSUYAMA[1,2], Yasuo OHNISHI[1,2]（[1]Grad. Sch. of Agric. and Life Sci., The Univ. of Tokyo, [2]CRIIM, The Univ. of Tokyo）

Pseudomonas putida 由来の XylS は *m*-トルイル酸 (*m*-TA) に応答し、Pm プロモーター下流遺伝子の転写を促進する転写制御因子である。我々は過去に Pm プロモーターがオンの時に ampicillin (Amp) 耐性かつ chloramphenicol (Cm) 感受性、オフの時にはその逆となる遺伝子モチーフを構築し、目的リガンドを認識する変異 XylS を Amp 耐性、目的リガンド以外に応答しないものを Cm 耐性により選抜するシステムを構築した。[1]本研究ではこのシステムを利用した網羅的変異スキャンにより、*m*-TA ではなく *p*-トルイル酸 (*p*-TA) を特異的に認識する変異 XylS の構築を目指した。

XylS のリガンド結合ドメイン (213 残基) の 1 残基ずつに飽和変異を導入したライブラリーを作製し、大腸菌に導入した。これを Amp と様々なリガンド、または Cm と *m*-TA 存在下で培養し、培養前後の各変異 XylS の存在比を次世代シーケンサーで網羅的に解析した。各変異 XylS の濃縮値 (培養後の存在比/培養前の存在比) をヒートマップに表し、その解析から G71 と H77 がリガンド認識の改変に重要なアミノ酸残基であると推定した。候補となる変異 XylS の中から複数を選抜しリガンド応答活性を測定した結果、G71 が置換された変異 XylS が *m*-TA をほとんど認識せずに *p*-TA を特異的に認識することがわかった。 [1] Ogawa *et al.*, *ACS Synth. Biol.* 2019, 8 (12), 2679–2689

XylS is a transcriptional activator in *Pseudomonas putida*. It binds *m*-toluic acid to induce transcription from Pm promoter. We previously constructed a gene circuit which makes the host ampicillin resistant and chloramphenicol sensitive when Pm promoter is activated, and *vice versa* when inactivated. Thus, we can screen XylS mutants that recognize a target compound by ampicillin resistance and do not recognize any non-target compounds by chloramphenicol resistance. The purpose of this study is to alter the ligand specificity of XylS so that it recognizes *p*-toluic acid instead of *m*-toluic acid by deep mutational scanning using this screening system.

A XylS library with all possible single amino acid substitutions at every residue of the ligand binding domain (1-213 aa) was constructed. The cells harboring it were cultivated in the presence of either ampicillin + *p*-toluic acid or chloramphenicol + *m*-toluic acid. The frequency of mutants before and after each selection were analyzed by a next generation sequencer. The enrichment ratios of mutants were calculated from the frequency and visualized by heatmaps. We predicted that G71- or H77-substituted XylS would specifically recognize *p*-toluic acid. G71-substituted XylS actually showed a high *p*-toluic acid specificity in the subsequent analysis.

protein engineering, biosensor, deep mutational scanning

講演番号：3I06-08
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:00～ ミーティングルームⅠ

効率的物質生産を実現する新規トランスポーター探索技術の開発

Development of Novel Transporter Screening Technology for Efficient Chemical Production by Microbial Fermentation

○七谷 圭、増田 歩、石井 智子、伊藤 隼哉、勝部 哲、米山 裕、仲川 清隆、阿部 敬悦 (東北大農)
○Kei Nanatani, Ayumu Masuda, Tomoko Ishii, Junya Ito, Satoshi Katsube, Hiroshi Yoneyama, Kiyotaka Nakagawa, Keietsu Abe (Tohoku Univ.)

【研究背景】　微生物を用いた物質生産において、標的化合物の生産効率化に向けて、細胞内代謝改変など様々な試みが行われている。アミノ酸、有機酸など標的化合物が膜不透過性の場合、最終産物は細胞内に蓄積し、生合成反応を負に制御するフィードバック反応により生産効率を低下させる。そこで、標的化合物を細胞外へ排出するトランスポーターの発現が必要となる。微生物のゲノムには、300-600 のトランスポーターがコードされている。しかしながら、トランスポーターの多くは機能の詳細な解析がなされておらず、正確なアノテーションをすることが困難である。トランスポーターの機能解析が進まない理由として、トランスポーターの細胞膜上での発現が困難であること、膜タンパク質として疎水性が高いため可溶性酵素と比べ扱いが困難であることが挙げられる。本研究では、機能未知トランスポーターの機能を解析するため、パートナーフュージョンタンパク質によるトランスポーターの発現効率改善と質量分析装置による網羅的な解析を組み合わせた手法を開発し、新規トランスポーターの同定と網羅的な基質の特異性の解析を実施した。
【方法・結果】　機能未知を含むコリネバクテリウム由来トランスポーター遺伝子をパートナーフュージョンタンパク質遺伝子(*mstX*)の下流にクローニングし、トランスポーター安定発現ライブラリを構築した。大腸菌 C43(DE3)株を宿主として、トランスポーターを発現させ、発現をウエスタンブロットにより確認した結果、*mstX*なしでは発現が観察できなかったトランスポーターの発現を確認することができた。次に、ライブラリを用いて、ペプチドフィーディング法によりアラニン排出輸送体の探索を行い、新規のアラニン排出輸送体を同定した。さらに、リジンエクスポーター(LysE)発現株の培養上清を質量分析装置(LC-MS, GC-MS 等)で分析することにより、LysE が従来報告されているよりも広い基質特異性を有し、様々な化合物の生産に応用できる可能性が示された。本研究の成果は、パートナーフュージョンタンパク質を用いた輸送体探索手法が、様々な化合物の輸送体探索に有効であることを示した。

In the production of chemicals by microbial fermentation, the export of chemicals from the cell becomes the rate-limiting step. In this study, we have developed an efficient method to search for efflux transporters by combining the stable expression of membrane transporters by fusion partner gene, *mstX*, with peptide feeding method or analysis of products by mass spectrometry. This study identified a novel alanine efflux transporter and showed that the lysine exporter (LysE) has a wide substrate specificity.

Fermentation, Transporter

発表責任者：阿部敬悦（keietsu.abe.b5@tohoku.ac.jp）

講演番号：3I06-09
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:00～ ミーティングルーム I

ミトコンドリアゲノム編集（mito-CRISPR）システムの開発とその応用

Development of mitochondrial DNA editing (mito-CRISPR) system and its application

○天井 貴光、辻 知佳、植田 充美、黒田 浩一 (京大院農)
○Takamitsu Amai, Tomoka Tsuji, mitsuyoshi Ueda, Kouichi Kuroda (Kyoto Univ)

【背景】

ミトコンドリアは ATP 合成やアポトーシス制御に関わる重要なオルガネラである。また、核とは別にミトコンドリア DNA（mtDNA）を独自に所有している。近年、ミトコンドリア機能不全の原因として、mtDNA の変異が報告されており、効率的な mtDNA 編集技術の開発が求められている。そこで、ゲノム編集技術である CRISPR-Cas9 システムをミトコンドリア内で機能させることにより、mtDNA を標的とした「mito-CRISPR システム」を開発し、出芽酵母 mtDNA 欠失株（ρ^0 株）作製への応用を試みた。

【方法・結果】

ミトコンドリア内の mtDNA を切断するためには、Cas9 タンパク質と gRNA を選択的にミトコンドリアへ輸送させる必要がある。ミトコンドリアターゲットシグナルを Cas9 タンパク質の N 末端に付加することで、ミトコンドリアへの輸送を確認した。標的 mtDNA（*ATP8*）を認識する gRNA を作製し、Cas9 タンパク質とともに導入する mito-CRISPR システムにより、mtDNA の切断を試みた。その結果、本システムにより出芽酵母 ρ^0 株を目的通りに作製することが可能となった [1]。

Mitochondria are organelles present in most eukaryotes that play important roles in ATP synthesis through oxidative phosphorylation and apoptosis, and have their own mitochondrial DNA (mtDNA). Deletion or mutation of mtDNA impairs mitochondrial function and causes a variety of diseases in human. Therefore, the development of the technologies for efficient mtDNA editing is desired for preparation of model organisms of mitochondrial disease and treatment of mitochondrial diseases. In this study, we attempted to establish an effective method for preparing *Saccharomyces cerevisiae* ρ^0 cells by activating the CRISPR-Cas9 system in mitochondria (mito-CRISPR system). This system was realized by the mitochondrial localization of Cas9 by fusing a mitochondrial target sequence to the N-terminus. The mito-CRISPR system allowed us to generate ρ^0 cells in *S. cerevisiae*.

[1] Amai *et al*. submitted

CRISPR-Cas9 system, Yeast mitochondrial DNA, rho^0 cell

発表責任者：天井　貴光（amai.takamitsu.37e@st.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3I06-10
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:00～ ミーティングルーム I

大規模マイクロサテライトデータベース「MiCAPs」の紹介
Introduction of large-scale microsatellite database "MiCAPs"

○田中 啓介（東京農大ゲノムセ）
○Keisuke TANAKA (Tokyo Univ. Agri.)

マイクロサテライト領域の反復多型情報を利用した分子系統解析や集団遺伝解析は、有効な研究アプローチの一つである。ところが、従来の有効なマイクロサテライト検出方法ではキャピラリーシーケンサーを利用することが多かったため、現実的に数～数十数遺伝子座の候補を挙げるのが時間的・コスト的・労力的に限界だった。以前、発表者を含む研究グループは、制限酵素もしくはソニケーションによる DNA 断片化、マイクロサテライト領域を含む DNA 断片濃縮と次世代シーケンサーを用いた Target capture sequence を介した「Microsatellite capture sequencing 法」を展開した。今回、発表者はこの方法によって得られる情報を基に様々な生物種からなるデータベースを構築したので、利用方法などについて説明を行う。

Molecular phylogenetic and population genetic analyses using microsatellite regions having simple sequence repeat polymorphisms are one of effective research approaches. However, the conventional utilizable microsatellite finding method was often limited listing candidates for several to several tens of loci in terms of time, cost, and effort, since it has been used a capillary sequencer. Previously, the research team including the presenter developed the ″Microsatellite capture sequencing method″ via DNA fragmentation by restriction enzyme or sonication, DNA fragment enrichment including microsatellite region, and target capture sequence using next-generation sequencer. Here, the presenter constructed a database consisting of various species based on microsatellite information obtained by this method. This presentation will introduce about how to use the database.

Microsatellite, Database, Genome

発表責任者：田中啓介（kt205453@nodai.ac.jp）

講演番号：3I06-11
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:00～ ミーティングルーム I

新型コロナウィルスを認識する DNA アプタマーの作製と迅速検出法の構築

Development of a rapid detection system for Covid-19 using DNA-aptamer raised against S-RBD.

○大坪 嘉行、永田 裕二（東北大院生命）
○Yoshiyuki Ohtsubo, Yuji Nagata (Tohoku Univ.)

新型コロナウィルスによって社会は大きな影響を受けた。もし 2 分程度で新型コロナウィルスを検出可能なシステムを構築できれば、社会的影響を大きく軽減できると期待される。本研究では、新型コロナウィルスを認識する DNA アプタマーの取得と、これを利用して高感度高精度検出系を構築することを目的とした。
コロナウィルス粒子の外側には S-タンパク質が突き出しており、これにより標的細胞のレセプターに結合する。本研究では S-タンパク質のレセプター結合ドメインに His タグを付加したタンパク質をヒト細胞で発現させて精製した S-RBD を用いてアプタマーDNA の取得を行なった。
2 つの primer 結合部位が N50 よりなるランダム部位を挟み込む形となっているランダム DNA ライブラリーを出発材料として、S-RBD を結合させた 2 種 His タグアフィニティ担体を用いて、S-RBD に結合する DNA アプタマーの取得を目指した。結合画分の取得と PCR 増幅のサイクルを繰り返したところ、わずかに結合を示す DNA プールを取得した。この DNA プールを用いて、2 つの DNA 分子をランダムに組み合わせた DNA プールを作製しサイクルを繰り返したところ、ゲルシフトアッセイによりはっきりと結合が確認できる DNA プールを得た。現在、アプタマーDNA 分子を多数装荷した分子を作製している。このような分子は強い親和性で新型コロナウィルスと結合して凝集体を形成してコロナウィルス迅速検出系の基盤となることが期待される。
The objective of this study is to develop a rapid method that utilizes DNA aptamer and detects the new corona virus SARS-CoV-2 in two minutes. Starting from a random DNA pool each having a N50 region surrounded by two primer annealing sites, and using His-tagged S-RBD (receptor binding domain of the S-protein) expressed and purified form human 293 cells, we obtained a pool that showed weak binding affinity to S-RBD. By combining two random DNA molecules, and repeating the selection cycles, we obtained a DNA pool that binds to S-RBD. Now, molecules having multiple copies of the DNA aptamer are being constructed, which should strongly bind to DNA aptamer and forms aggregates upon binding to the new corona virus.

SARS-CoV-2, DNA aptamer, detection system

発表責任者：大坪嘉行（yohtsubo@ige.tohoku.ac.jp）

講演番号：3I06-12
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:00～ ミーティングルーム I

カイコを用いたウイルス様粒子への効率的な抗原提示システムの開発

Development of an efficient antigen display system for Virus-Like Particles in silkworm

○関口 智史[1]、徐 剣[2]、加藤 竜也[3]、朴 龍洙[3]([1]静大・総科技院、[2]中国華東師範大学・生命科学府・医学合成生物研究センター、[3]静大グリーン研)
○Tomofumi SEKIGUCHI[1], Jian XU[2], Tatsuya KATO[3], Enoch Y PARK[3] ([1]Dept. Agric. Grad. Sch. Integr. Sci. Tech., Shizuoka Univ., [2]Biomed. Synth. Biol. Res. Ctr., Sch. of Life Sci., East China Normal Univ., [3]Res. Inst. Green Sci. Tech., Shizuoka Univ.)

ウイルス様粒子（VLPs）ワクチンはウイルス骨格を持つが遺伝子物質を持たない、感染性リスクの無い安全なウイルス粒子である。また、VLP は細胞性免疫も上昇させることが知られており、VLP 表面に新たな抗原タンパク質を提示させることでさらなる免疫誘導が期待できる。本研究では、in vitro で VLP 表面に抗原タンパク質の提示を制御できるシステムの構築を目指した。VLP 骨格として Canine parvovirus の構造タンパク質 viral protein 2（VP2）を用いた。Streptococcus pyogenes のフィブロネクチン結合タンパク質由来の SpyTag(ST)/SpyCatcher(SC)共有結合システムを利用した。Canine parvovirus-like particle（CPV-LP)表面に EGFP（抗原モデルタンパク質）の提示を行った。ST 挿入部位として、VP2 の N’末端及び S226-G227、T391-G392（CPV-LP 表面ループ）を用いた VP2 をカイコ脂肪体で発現・精製を行い CPV-LP の形成を確認した。さらに SC-EGFP 融合タンパク質と CPV-LP のライゲーション反応により CPV-LP 表面への EGFP 提示を試みた。得られた CPV-LP を SDS-PAGE や immuno TEM によって抗原提示の確認を行い、CPV-LP 表面の抗原提示の制御が可能であることを見いだした。

Virus-like particles (VLPs) assemble from structural proteins automatically without incorporating viral genetic materials. In this regard, vaccines from VLPs are relatively safe with no infectious risk. VLP vaccines are also known to trigger better cellular immunity, and the surface presentation of antigen proteins could induce additional and specific responses. This study aimed to construct a controllable antigen-displaying VLP platform *in vitro* combining silkworm expression system and SpyTag (ST)/SpyCatcher (SC) chemistry. The viral structural protein 2 (VP2) of *Canine parvovirus* and enhanced green fluorescent protein (EGFP) were employed as the VLP matrix and model antigen protein, respectively. To rationally improve the display abundancy, we further investigated the ST-tag location sites in VP2, N-terminal, Loop1 (S226-G227), and Loop2 (T391-G392) regions. In this study, all ST-VP2 and SC-EGFP proteins were expressed and purified from silkworm fat bodies. The formation of VLPs was confirmed in TEM, and the display of SC-EGFP via *in vitro* ligation with ST-VP2 was verified by SDS-PAGE and immuno-TEM. Taken together, we successfully established a promising antigen-display CPV-LP platform in silkworm.

Virus-like particles, Bombyx mori, Canine parvovirus

講演番号：3I06-13
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:00～ ミーティングルーム I

ノロウイルスの高感度オンサイト検出に関する研究

High-sensitive on-site detection of norovirus

○敦賀 健太、アンカン チョードリー、朴 龍洙（静岡大農）
○KENTA TSURUGA, Chowdhury Ankan, Enoch Y. PARK (Shizuoka Univ.)

ノロウイルス（NoV）は、散発性及び流行性の胃腸疾患を引き起こす可能性のある食中毒原因ウイルスであり、迅速で高感度な NoV 検出法の開発は、食中毒の発生や、拡大を防ぐ上で極めて重要である。現在、NoV の検出においては、リアルタイム RT-PCR 法や EIA（Enzyme Immuno Assay）キットを用いた方法が用いられているが、操作の煩雑さや感度の問題がある。そこで本研究では、この問題を解決するために、迅速で高感度、簡便な NoV の検出を、電気化学的手法を用いた検出及び発生現場での検出を目的とした。NoV と特異的に結合する抗体修飾した市販のスクリーンプリント電極（SPE）を用意し、NoV との抗原抗体反応による電極の NoV 依存性インピーダンス値を指標に調査も行った。実験の結果、10 fg/ml～1 ng/ml のウイルス濃度範囲において濃度依存的にインピーダンス値を指標にウイルス濃度を検出した。また、オンサイト検出への応用に向けてステンレス板上での NoV のふき取り調査も行った。実験の結果、10 fg/ml～1 ng/ml のウイルス濃度範囲において濃度依存的にインピーダンス値が増強した。検出限界は、30.7 fg/ml であった。また、インピーダンス値の増加幅は最大で 21.8 倍であった。ふき取り調査についても同様の結果が得られ、インピーダンス値の増加幅は最大で 9.7 倍であった。以上の結果は、SPE を用いた NoV のオンサイト検出の可能性を示唆するものである。

Norovirus (NoV) is a food poisoning virus that can cause sporadic and epidemic gastrointestinal diseases. The development of rapid and sensitive methods for NoV detection is essential in preventing outbreaks and spreading food poisoning. Currently, real-time RT-PCR and Enzyme Immuno Assay (EIA) kits are used to detect NoV, but they are cumbersome to operate and have sensitivity problems. In this study, we aimed to develop a rapid, sensitive, and simple method for the detection of NoV using an electrochemical detection method and to apply this method to the on-site detection of NoV. The impedance of the electrode was detected dependent on the virus concentration. Wiping of NoV on a stainless-steel plate for on-site detection was also performed. Experimental results showed a concentration-dependent enhancement of the impedance value in the NoV concentration range of 10 fg/ml to 1 ng/ml. The detection limit was 30.7 fg/ml. The maximum increase in impedance value was 21.8 times. Similar results were obtained for the wiping survey, where the maximum increase in impedance value was 9.7 times. These results suggest that the detection of NoV using disposable electrodes has a potential application to on-site detection of the NoV.

virus detection, electrochemical, Gold polyaniline

発表責任者：朴　龍洙（park.enoch@shizuoka.ac.jp）

講演番号：3I06-14
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:00～ ミーティングルーム I

イヌの肥満細胞腫における遺伝子変異の簡易・迅速な検出

A rapid detection of gene mutations in canine mast cell tumors

○奥村 史朗[1]、日下 芳友[1]、大里 義治[2] ([1]福岡県工技セ、[2]有限会社カホテクノ)
○Shiro OKUMURA[1], Yoshitomo KUSAKA[1], Yoshiharu OHSATO[2] ([1]Fukuoke ITC, [2]Kahotechno Ltd.)

肥満細胞腫は犬の皮膚腫瘍の中で最も多い腫瘍の一つで、その悪性度に応じて、手術、放射線照射、抗がん剤投与などの治療を行う。c-KIT 遺伝子における変異が原因の場合にはイマチニブなどの分子標的薬による治療が有効とされており、遺伝子変異検出の需要がある。c-KIT 遺伝子における変異には一塩基置換、欠損、重複、重複および欠損など多くの種類が報告されており、それぞれについて検出を行う必要がある。また病理検査のために作成されたホルマリン固定パラフィン包埋サンプルを対象に検出を行うことが多く、その場合には DNA の断片化やタンパク質との架橋が生じるため信頼性の高い検査が困難である。そこで、loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 法を用いた、迅速かつ簡易な c-KIT 遺伝子の変異検出法の開発に取り組んだ。LAMP 法は、特殊な DNA ポリメラーゼと 4 種類のプライマーとにより、定温、短時間で加速度的に遺伝子を増幅する手法で、溶液の白濁から目視で結果を判定することが可能である。通常は遺伝子の検出、例えば食中毒菌が食品サンプル中に存在するかどうかといった判定に用いられているが、本研究においては c-KIT 遺伝子の変異検出を目的としてプライマーを設計し、標準サンプルにおいて良好な判定結果を得た。今後はイヌから採取した遺伝子サンプルについて、開発した手法による判定の検証を進めていく。

Canine mastocytoma is one of the most common skin tumors, and treatment such as surgery, irradiation, and administration of anticancer drugs is performed according to the malignancy. When the cause of the cancer is a mutation in the c-KIT gene, the treatment with a molecular-targeted drug such as imatinib is effective, and therefore there is a demand for the gene mutation detection. Many types of mutations in the c-KIT gene have been reported, including single nucleotide substitutions, deletions, duplications, and "duplication and deletion", and it is necessary to detect each of them. Formalin-fixed paraffin-embedded samples prepared for the pathological examination are often used to detect the gene mutations. In that case, DNA fragmentation and cross-linking with proteins occur, which makes reliable testing difficult. Therefore, we are developing a rapid and simple detection method for the mutations by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method. The LAMP method amplifies genes at a constant temperature in a short time by using a special DNA polymerase and four types of primers, and the result can be visually judged from the cloudiness of the solution. It is usually used for gene detection, not for mutations, but in this study, we designed a primer that can detect c-KIT gene mutations, and appropriate judgment results were obtained for the standard samples. From now on, we will verify the judgment of the gene sample collected from dogs by our developed method.

canine mast cell tumors, loop-mediated isothermal amplification, single nucleotide substitution

発表責任者：奥村史朗（sokumura@fitc.pref.fukuoka.jp）

講演番号：3I06-15
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:00～ ミーティングルーム I

DNA 免疫を用いたウサギモノクローナル抗体取得法の開発

Development of rabbit monoclonal antibody acquisition using DNA immunization

○木原 もなみ[1,2]、アディネゴロ ダッファ ショーン[1]、兒島 孝明[1,2]、長谷 哲成[3]、榎本 篤[3]、中野 秀雄[1,2] ([1]名大院生命農、[2]日本農芸化学会、[3]名大院医)
○MONAMI KIHARA[1,2], DAFFA SEAN ADINEGORO[1], TAKAAKI KOJIMA[1,2], TETSUNARI HASE[3], ATSUSHI ENOMOTO[3], HIDEO NAKANO[1,2] ([1]Nagoya Univ. Bio Agr, [2]JSBBA, [3]Nagoya Univ. MED)

我々のグループでは、動物の末梢血や組織から B 細胞を単離し、1 細胞逆転写反応と PCR により得られた L 鎖と H 鎖の DNA フラグメントを、無細胞タンパク質合成系により Fab(fragment of antigen binding)として発現させ評価する、迅速なモノクローナル抗体取得技術である（Ecobody 法）を開発した。本研究では、この Ecobody 法と DNA 免疫を組み合わせることで、抗原発現と精製を必要とせず、迅速に抗原特異的なウサギモノクローナル抗体を取得する技術開発を行っている。

膵臓がんを抑制する線維芽細胞の特異的マーカーとして着目されている Meflin の発現プラスミドを一週間間隔で４回 DNA 免疫を行った。Meflin 発現プラスミドを導入した細胞およびその培養上清を抗原として、各週に採取した血清を用いた ELISA を行ったところ、顕著に抗体価が上昇していた。

今後全採血ののち、Meflin 発現細胞などに結合する B 細胞を単離し、Ecobody 法によって抗原特異的なウサギモノクローナル抗体のクローニングとその性質決定を行う予定である。

Our group has developed a rapid monoclonal antibody acquisition method (named Ecobody technology), in which antibody genes from isolated single B cells from peripheral blood or tissues of animals are amplified by single-cell reverse transcription and several rounds of PCR, followed by cell-free protein synthesis, resulting in a generation of Fab fragment in a very high-throughput manner.

In this study, a rabbit was immunized with a mammalian-expression plasmid DNA for Meflin, a potent biomarker for the suppression of pancreatic cancer, four times at weekly intervals. An increase in antibody titers was detected by ELISA using serum collected against at each week Meflin-expressing HEK293T cells and its culture supernatant. We are going to select B cells binding the Meflin-expressing cells and to obtain rabbit monoclonal antibodies from thus isolated single B cells by the Ecobody technology.

monoclonal antibody, cell free protein synthesis system, DNA immunization

発表責任者：木原もなみ（kihara.monami@e.mbox.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：3J02-01
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:30～ ミーティングルーム J

Notch シグナルと TGF-β シグナルの相互依存的な作用が粘膜型マスト細胞の分化を促進させる

Mucosal mast cell differentiation is promoted by interdependent action of Notch and TGF-ß signaling

○中野 信浩[1]、才田 一樹[1,2]、北浦 次郎[1]、八代 拓也[2]、西山 千春[2]、奥村 康[1]、小川 秀興[1]（[1]順天堂大院医、[2]東理大基礎工）
○ Nobuhiro NAKANO[1], Kazuki SAIDA[1,2], Jiro KITAURA[1], Takuya YASHIRO[2], Chiharu NISHIYAMA[2], Ko OKUMURA[1], Hideoki OGAWA[1] ([1]Juntendo Univ., [2]Tokyo Univ. of Sci.)

腸管粘膜に局在する粘膜型マスト細胞は、食物アレルギーの発症や寄生虫の排除において中心的な役割を果たしている。粘膜型マスト細胞は粘膜組織内で分化・成熟することが知られているが、分化の誘導メカニズムはよくわかっていない。本研究では、粘膜型マスト細胞の分化誘導因子の一つ TGF-β と、以前我々が見いだした分化誘導因子 Notch リガンドが、分化を引き起こす分子的なメカニズムをマウス骨髄由来マスト細胞を用いて明らかにした。Notch シグナルと TGF-β シグナルは、粘膜型マスト細胞マーカー分子であるプロテアーゼ mMCP-1、mMCP-2 及び接着分子 CD103 の発現誘導において、相乗的かつ相互依存的に働くことが示された。これらのマーカー分子発現は SMAD4 依存的であったが、Notch シグナルは SMAD4 の核移行を引き起こし、SMAD4 依存的な遺伝子発現を促進することが示された。さらに、Notch シグナルは mMCP-1 及び mMCP-2 遺伝子プロモーター領域のエピジェネティック修飾を介して SMAD4 依存的な転写を増強させることも示された。これらの結果は、粘膜型マスト細胞が関与する疾患の病態を理解する上で有用であると考えられる。

Mucosal mast cells (MMCs) localized in the intestinal mucosa play a central role in the development of IgE-mediated food allergies or the expulsion of helminth parasites. MMCs are known to differentiate from mast cell progenitors in mucosal tissues. However, little is known about the mechanism of mucosal mast cell differentiation. In this study, we have elucidated the molecular mechanism by which TGF-β and Notch ligand induce mucosal mast cell differentiation using mouse bone marrow-derived mast cells. Our studies indicate that Notch and TGF-β signaling acted synergistically and interdependently in the induction of expression of MMC markers, mouse mast cell protease (mMCP)-1, mMCP-2, and CD103. These marker expressions depended on the transcription factor SMAD4. Notch signaling promoted the nuclear localization of SMAD4, causing SMAD4-dependent gene expression. In addition, Notch signaling markedly upregulated mMCP-1 and mMCP-2 expression levels through epigenetic deregulation of the promoter regions of these genes. These results may be useful in understanding the pathological mechanisms of diseases involving mucosal mast cells.

Mucosal mast cell, Notch signaling, TGF-ß

発表責任者：中野信浩（nbnakano@juntendo.ac.jp）

講演番号：3J02-02
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:30～ ミーティングルーム J

腸内細菌代謝産物スカトールは、AhR 活性化と p38 の活性化に伴う TNFα/TNFR1 経路を介して腸管細胞の細胞死を導く

Skatole, an intestinal bacterial metabolite, leads to death of intestinal epithelial cells through not only activation of AhR but also TNFα/TNFR1 pathway induced by p38.

○石井 克範[1]、古東 義仁[2]、蔵田 航一[3]、清水 英寿[4] ([1]島大・生資、[2]島大院・自然、[3]島大院・生資、[4]島大・学術)
○Katsunori Ishii[1], Yoshihito Koto[2], Koichi Kurata[3], Hidehisa Shimizu[4] ([1]Fac. Life. Envi. Sci, Shimane Univ, [2]Grad. Sch. Nat. Sci. Tech, Shimane Univ, [3]Grad. Sch. Life. Envi. Sci, Shimane Univ, [4]Inst. Agri. Life. Sci., Aca, Ase, Shimane Univ.)

炎症性腸疾患は、慢性的な腸管の炎症状態を引き起こす難病であり、その詳細な発症メカニズムは未だ不明である。近年、その発症要因の一端として、食の欧米化に伴う高食肉摂取や、腸内細菌代謝産物の関与が指摘されている。そこで本研究では、主に高食肉摂取時に腸内で産生されるスカトールが腸管細胞に与える影響について解析することを目的とした。スカトールは培養腸管細胞である Caco-2 細胞において、aryl hydrocarbon receptor (AhR) を活性化させるだけでなく、AhR 非依存的に MAP キナーゼである ERK、p38、JNK を活性化させた。特に、活性化された p38 は、炎症性腸疾患の発症・進展要因である炎症性サイトカインの 1 つ tumor necrosis factor-α (TNF-α)と、その受容体である tumor necrosis factor receptor 1 (TNFR1) の発現誘導を惹起した。さらに、スカトールによって引き起こされる細胞死が、TNF-αの中和抗体および TNFR1 と AhR のそれぞれのアンタゴニスト処理によって一部抑制された。以上から、スカトールによる腸管細胞の細胞死には、AhR 依存的な経路と AhR 非依存的に活性化される p38 を介して発現誘導される TNF-α/TNFR1 の経路が関与していることが明らかとなった。したがって、高食肉摂取に伴う炎症性腸疾患の発症・進展には、スカトールを起点とした上記の経路が関わる可能性が示唆された。

Inflammatory bowel disease (IBD) is an incurable disease that causes a chronic inflammatory condition of the intestinal tract, and its detailed pathogenic mechanism is still unknown. Recently, in addition to high meat consumption associated with the western diet and produced metabolite by intestinal microbiota may be involved in the pathogenesis of the disease. Thus, the present study focused on the relationship between skatole, which is synthesized from intestinal bacteria in the intestine during high meat consumption, and its effects on intestinal epithelial cells (IECs). As results, skatole not only activated AhR but also activated MAP kinases such as ERK, p38, and JNK through AhR-independent pathway in IECs. In addition, the expression levels of TNF-α, an inflammatory cytokine that is a factor in the development and progression of IBD, and its receptor, TNFR1, expression was upregulated by p38 activation induced by skatole. Furthermore, neutralizing antibodies for TNF-α, and antagonists for TNFR1 and AhR partially suppressed the death of IECs induced by Skatole. Taken together, our results indicate that AhR activation, and upregulation of TNF-α and TNFR1 expression induced by AhR-independent activation of p38 are involved in death of IECs elicited by skatole. Therefore, the initiation and progression of IBD by high meat consumption may be due to activation of above pathway induced by skatole.

Tryptophan metabolites, Aryl hydrocarbon receptor, TNFα/TNFR1 pathway

発表責任者：清水英寿（hideshmz@life.shimane-u.ac.jp）

講演番号：3J02-03
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:30～ ミーティングルーム J

Expression regulation mechanism of SLC26A3 by indole-3-acetic acid is different in culture stages of Caco-2 cells

○Md. Mazharul Islam Chowdhury[1], Yoshihito Koto[2], Koichi Kurata[3], Katsunori Ishii[4], Ayame Tomii[4], Kohji Nishimura[1,2,3,4,5], Hidehisa Shimizu[1,2,3,4,5] ([1]United Grad. Sch. Agr. Sci., Tottori Univ., [2]Grad. Sch. Nat. Sci. Tech, Shimane Univ., [3]Grad. Sch. Life. Envi. Sci, Shimane Univ., [4]Fac. Life. Envi. Sci, Shimane Univ., [5]Inst. Agr. Life. Sci., Aca, Ase, Shimane Univ.)

Much attention in recent years has focused on colorectal cancer (CRC) due to worldwide increasing mortality rate along with the growing incidences of 1 million new cases every year. Because the expression level of SLC26A3 is downregulated in CRC, it is considered to be involved in suppression of CRC growth. In addition, indole-3-acetic (IAA), a gut microbiota-derived tryptophan metabolite, is also reported to participate in attenuation of CRC progressoin. Therefore, the present study aimed to analyze the relationship between SLC26A3 and IAA. As results, stimulation of Caco-2 cells with IAA resulted in a significant increase in the mRNA levels of SLC26A3 expression for 3hours to 8 days. Since IAA is known as a ligand for aryl hydrocarbon receptor (AhR), we next checked whether AhR activation induced by IAA is involved in the upregulation of SLC26A3 expression. CH223191, an antagonist for AhR, suppressed SLC26A3 mRNA expression induced by IAA at 3 hours but not at 8 days after stimulation. Furthermore, Toll-like receptor 4 (TLR4) as other regulation mechanism of SLC26A3 expression by IAA was focused. TAK242, an antagonist for TLR4, inhibited SLC26A3 mRNA expression induced by IAA at 3 hours whereas promoted its expression induced by IAA at 8 days after stimulation. Taken together, the present results suggest that IAA regulates the mRNA expression levels of SLC26A3 through activating AhR and TLR4 in Caco-2 cells. More notably, the mechanism for the regulation of SLC26A3 expression by IAA-induced activation of AhR and TLR4 is different depending on the culture stage of Caco-2 cells.

Tryptophan metabolite, Aryl hydrocarbon receptor, TNF-α/TNFR1 pathway

発表責任者：Hidehisa Shimizu（hideshmz@life.shimane-u.ac.jp）

講演番号：3J02-04
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:30～ ミーティングルーム J

低分子量 G タンパク質 RhoQ は TGF-β1 誘導性 EMT を抑制する

RhoQ, a member of Rho GTPase, suppresses TGF-β1 mediated EMT in A549 cells.

○佐藤 琴音[1]、野崎 未紗[2]、西塚 誠[1,2] ([1]弘大農生、[2]弘大院地域共創)
○Kotone SATOU[1], Misa NOZAKI[2], Makoto NISHIZUKA[1,2] ([1]Fac. of Agri. and Life Sci., Hirosaki Univ., [2]Grad. Sch. of Sustain. Community Stud., Hirosaki Univ.)

【目的】がんの浸潤・転移に関与する重要なプロセスとして、上皮形態から間葉形態に細胞が変化する上皮間葉転換 epithelial to mesenchymal transition (EMT)が知られている。当研究室では、細胞のアクチン骨格の形成を制御する低分子量 G タンパク質であり、神経突起形成の誘導に関与している RhoJ が EMT の制御を介してがん細胞の浸潤を抑制していることを明らかにした。しかしながら、RhoJ と同じ Rho ファミリーに属し、アミノ酸配列が類似した RhoQ が EMT の進展に与える影響は不明である。そこで本研究では、TGF-β1 誘導性 EMT における RhoQ の役割について検討した。
【方法】ヒト肺がん細胞由来 A549 細胞の TGF-β1 誘導性 EMT 過程において RhoQ の発現を抑制し、細胞形態、EMT 関連遺伝子の発現等を評価することにより、RhoQ の役割について検討した。
【結果および考察】まず、細胞の長径と短径を計測し、その比から細胞の紡錘形態への変化を評価した。その結果、コントロール細胞と比較して、RhoQ 発現抑制細胞では紡錘形態へより強く変化していることがわかった。次に、EMT マーカーの発現について検討したところ、RhoQ 発現抑制細胞において、上皮系マーカーである E-cadherin の発現は減少し、間葉系マーカーである Fibronectin の発現は上昇した。これらの結果より、RhoQ は EMT を抑制する働きがあることが示唆された。さらに、RhoQ の発現抑制は、EMT の初期に重要な役割を担う転写因子 Snail の発現と Smad3 のリン酸化レベルを上昇させた。以上の結果から、RhoQ の発現抑制は Smad3 のリン酸化および Snail の発現調節を介して、EMT を促進することが示唆された。

Epithelial to mesenchymal transition (EMT) is an important process for invasion and metastasis of cancer cell. RhoQ, a member of Rho GTPase, regulates cytoskeleton formation and contributes to the induction of neurite formation. However, the role of RhoQ in EMT remains unclear. In this study, we examined the role of RhoQ in TGF-β1 mediated EMT of human non-small cell lung cancer cell line A549.

The cells were transfected with siRNA targeting RhoQ. We showed that the degree of cell elongation significantly increased in RhoQ knockdown cells treated with TGF-β1. Furthermore, expression level of Fibronectin, a mesenchymal marker was elevated, whereas the expression of E-cadherin, an epithelial marker decreased in RhoQ knockdown cells. In addition, RhoQ knockdown positively regulated Snail expression and Smad3 phosphorylation at the early stage of EMT. These results suggested that knockdown of RhoQ expression enhances TGF-β1 mediated EMT in A549 cells through the control of TGF-β-Smad signaling.

RhoQ, EMT, A549

発表責任者：西塚誠（nishizuka@hirosaki-u.ac.jp）

講演番号：3J02-05
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:30～ ミーティングルーム J

低分子量 G タンパク質 RhoJ は TGF-β/Smad シグナルを介し、非小細胞肺がんの EMT を抑制する
Rho GTPase RhoJ suppresses EMT via TGF-ß/Smad signaling in NSCLC

○野崎 未紗[1]、西塚 誠[1,2] ([1]弘大院地域共創、[2]弘大農生)
○Misa NOZAKI[1], Makoto NISHIZUKA[1,2] ([1]Grad. Sch. of Sustain. Community Stud., Hirosaki Univ., [2]Fac. of Agri. and Life Sci., Hirosaki Univ.)

【目的】低分子量 G タンパク質 RhoJ の発現が非小細胞肺がん(NSCLC)の患者において低下しており、RhoJ が NSCLC に対して抑制的な役割を担う可能性がバイオインフォマティクス解析により最近示された。細胞のアクチン骨格形成を制御する RhoJ は血管新生の制御などに寄与することが報告されているが、NSCLC における詳細な役割は不明である。そこで、本研究では、がんの浸潤・転移に関わる重要なプロセスである上皮間葉転換 epithelial to mesenchymal transition (EMT)に着目し、非小細胞肺がん細胞の EMT および浸潤過程における RhoJ の役割について検討を行った。
【方法】非小細胞肺がん由来 A549 細胞に TGF-β1を添加し、EMT を誘導した。さらに RhoJ を標的とした siRNA を用いて RhoJ の発現を抑制し、EMT ならびに浸潤能に与える影響について検討した。
【結果ならびに考察】まず、EMT を誘導した RhoJ 発現抑制細胞の形態変化を観察した。その結果、コントロール細胞と比較して RhoJ 発現抑制細胞はアクチンストレスファイバーが増強された。さらに、細胞の短径と長径の比を計測した結果、RhoJ の発現抑制により細胞が紡錘形態へより強く誘導されたことが明らかになった。次に、EMT 関連遺伝子の発現に RhoJ 発現抑制が与える影響を検討した。その結果、RhoJ の発現抑制により上皮系マーカーE-cadherin の発現が減少する一方、間葉系マーカーFibronectin の発現が上昇した。上記検討に加え、細胞の浸潤能を検討したところ、RhoJ 発現抑制細胞において浸潤能が上昇した。これらの結果から、RhoJ が TGF-β1 誘導性 EMT を抑制することが示された。さらに、RhoJ の発現を抑制すると EMT 初期に機能する Smad3 のリン酸化レベルおよび転写因子 Snail の発現が上昇することも明らかにした。以上の結果から、RhoJ が TGF-β/Smad シグナルを介して EMT を制御し、非小細胞肺がんの浸潤を抑制することが示唆された。

Recently, Bioinformatics analysis showed that lower expression of RhoJ was observed in patients with non-small cell lung cancer (NSCLC) compared with normal people, but the role of RhoJ in NSCLC is unclear. In this study, we examined the role of RhoJ in epithelial to mesenchymal transition (EMT), an important process for invasion and metastasis, of NSCLC cell line A549.

Thick stress fibers and degree of cell elongation were increased in RhoJ knockdown cells treated with TGF-β1. Furthermore, expression level of Fibronectin was elevated, whereas expression level of E-cadherin was decreased in RhoJ knockdown cells. In addition, RhoJ knockdown upregulated invasion ability of A549 cells that have undergone EMT. We also indicated that Smad3 phosphorylation and Snail expression were elevated at the early stage of EMT in RhoJ knockdown cells compared with those in control cells. These findings suggest that RhoJ suppresses invasion through the regulation of EMT in NSCLC cells.

RhoJ, cancer, EMT

発表責任者：西塚誠（nishizuka@hirosaki-u.ac.jp）

講演番号：3J02-06
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:30～ ミーティングルーム J

Methylglyoxal is Involved in Insulin Resistance via Activation of mTORC1/S6K Pathway in Adipocytes

○Su Ping NG[1], Wataru Nomura[1,2], Haruya Takahashi[1], Kazuo Inoue[1,2], Tsuyoshi Goto[1,2], Teruo Kawada[1,2], Yoshiharu Inoue[3] ([1]Div. of Food Sci. & Biotechnol., Grad. Sch. of Agric., Kyoto Univ., [2]Research Unit for Physiological Chemistry, Kyoto Univ., [3]Kyoto Univ. Biostudy)

Metabolites from energy-generating processes function not simply as metabolic intermediates but also as modulators of cellular functions. Methylglyoxal (MG) is derived from glycolysis. Despite being a natural metabolite, MG is recognized as an exacerbating factor of some pathological conditions including diabetes. However, it largely remains unclear how MG exacerbates diabetes.

Since adipocytes play an important role in physiological energy homeostasis by converting excess glucose to triglyceride for storage through the insulin-stimulated signaling pathway, their dysfunction contributes to the exacerbation of diabetes. Here, we show that MG attenuated insulin-stimulated activation of the insulin signaling pathway in 3T3-L1 adipocytes and consequently decreased glucose uptake. We found that MG-treated 3T3-L1 adipocytes increased phosphorylation of serine residues at insulin receptor substrates (IRS), which attenuated insulin signaling. p70S6 kinase (S6K) is one of the kinases responsible for the serine phosphorylation of IRS, and constitutes the mTORC1-S6K signaling pathway. MG increased the phosphorylation of S6K in a mTORC1-dependent manner; however, activity of AKT, the well-known upstream regulator for the mTORC1-S6K pathway was not necessary for its phosphorylation. We found that MG rapidly induced the phosphorylation of p38 MAP kinase, and inhibition of p38 blocked the MG-induced activation of the mTORC1-S6K pathway. p38 responds to various stimuli, one of which is reactive oxygen species (ROS). Since various reports have linked MG to increased intracellular ROS, we next investigated whether ROS production is required for the MG-induced mTORC1-S6K activation using N-acetylcysteine (NAC), a ROS scavenger. NAC had no effect on MG-induced activation of p38 and the mTORC1-S6K pathway, and there was no significant increase in ROS production by MG at the time period in which phosphorylation of p38 occurred. Taken together, these findings suggest that MG provokes insulin resistance in adipocytes via p38 in a ROS-independent manner.

Methylglyoxal, Adipocytes, Insulin Signaling Pathway

発表責任者：野村　亘（nomura.wataru.4r@kais.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3J02-07
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:30～ ミーティングルーム J

ヒト多剤輸送体 MDR1 の基質依存的活性がコレステロールによって誘導される機構の熱力学的解析
Thermodynamic analysis of the enhancement of substrate-dependent ATPase activity of MDR1 by cholesterol.

○岩村 紗花[1]、木岡 紀幸[1]、植田 和光[2]、木村 泰久[1] ([1]京大院・農・応用生命、[2]京大・iCeMS)
○Sahana IWAMURA[1], Noriyuki KIOKA[1], Kazumitsu UEDA[2], Yasuhisa KIMURA[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Kyoto Univ. iCeMS)

【背景・目的】

MDR1(ABCB1)は、ABC タンパク質ファミリーに属する多剤輸送体であり、ATP の結合・加水分解によるエネルギーを利用して、構造に類似性の無い様々な脂溶性化合物を細胞外へと排出する。先行研究では、MDR1 の基質依存的な ATP 加水分解活性が脂質二重膜に含まれるコレステロールによって促進されることが報告された。この活性促進には輸送基質に対する K_m の減少(親和性の上昇)と V_{max} の増加(最大活性の上昇)が関与している。K_m の減少に関しては分子量が小さい基質でのみ見られたことから、コレステロールが基質結合部位を埋め合わせるモデルが提唱された。一方で、V_{max} が増加するメカニズムは未だ不明である。そこで本研究では、コレステロールによる V_{max} 誘導の熱力学的プロファイルを調べることで、V_{max} 誘導の詳細なメカニズムを解析した。

【方法・結果】

本研究では、MDR1 精製標品をコレステロール含有人工脂質二重膜(リポソーム)に再構成し、ATP 加水分解活性を測定することで MDR1 の機能を評価した。まず熱力学的解析を行なうにあたり、反応温度幅、反応時間や基質濃度の検討を行い最適な条件を決定した。次に 4 種類の基質を用いて解析を行なったところ、どの基質でもコレステロールの添加によって $\Delta H^{\ddagger}$ および $T\Delta S^{\ddagger}$ が増加することが明らかとなった。コレステロールによる V_{max} 誘導が大きい基質ほど $T\Delta S^{\ddagger}$ の増加が大きいことから、V_{max} の増加は $\Delta S^{\ddagger}$ の増加によるものであり、MDR1 の輸送サイクル中にコレステロールや溶媒である水の自由度、あるいは MDR1 の構造のゆらぎが増す可能性が示唆された。

MDR1 is a multidrug transporter, which effluxes various hydrophobic compounds from cells by using the energy of ATP hydrolysis. It has been suggested that cholesterol enhances substrate dependent ATPase activity of MDR1 by increasing affinity (K_m) and velocity (V_{max}). In this study, we examined the thermodynamic profile to elucidate the mechanism of the V_{max} enhancement and found that the enthalpy change is important for the enhancement of V_{max}.

ABC protein, MDR1, thermodynamic analysis

講演番号：3J02-08
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:30～ ミーティングルーム J

リポソームを用いたヒト ABCA1 のステロール特異性解析

The analysis of the sterol specificity of human ABCA1 using liposomes

○坂田 和樹[1]、木岡 紀幸[1]、植田 和光[2]、木村 泰久[1]（[1]京都大農、[2]京都大・iCeMS）
○Kazuki SAKATA[1], Noriyuki KIOKA[1], Kazumitsu UEDA[2], Yasuhisa KIMURA[1] ([1]Kyoto Univ., [2]iCeMS Kyoto Univ.)

ABCA1 は ATP のエネルギーを利用する脂質輸送体であり、細胞内の余剰のコレステロールおよびリン脂質を細胞外の脂質受容体へと受け渡すことで、HDL の前駆体を産生する。血中 HDL 濃度は動脈硬化症の発症リスクと逆相関するため、ABCA1 はコレステロール恒常性を保つ重要なタンパク質として注目されているが、ABCA1 による脂質輸送メカニズムは未だ不明である。ABCA1 の機能を詳細に理解するには、精製タンパク質を用いた解析が不可欠であるが、これまで精製 ABCA1 を用いたコレステロール依存的な ATP 加水分解活性の誘導は見られていない。そこで、膜タンパク質を脂質二重膜に再構成する系を用いて ABCA1 の基質輸送・基質依存性を評価する手法の構築を目指した。

ヒト浮遊細胞株である FreeStyle293 細胞を用いて ABCA1 を発現させ、抗 FLAG 抗体を用いたアフィニティークロマトグラフィーによって ABCA1 を精製した。精製 ABCA1 をさまざまな脂質組成のリポソームに再構成した後で、メチルβシクロデキストリン(MβCD)を用いてリポソームにコレステロールを添加し、ATP 加水分解活性を測定した。その結果、ABCA1 の ATP 加水分解活性がコレステロール依存的に有意に上昇する脂質組成を決定した。さらに、MβCD を用いて数種類のステロールを添加して ATP 加水分解活性を測定した結果、デスモステロールがコレステロールと同様に ABCA1 の活性を上昇させることが分かった。現在、さらに広範囲のステロールを用いて ABCA1 の活性に与える影響を詳細に解析している。

ABCA1 is an ATP-driven transporter and generates nascent HDL by exporting excess cholesterol and phospholipids to apoA-I. Although ABCA1 is important for cholesterol circulation in our body, the detail mechanism of ABCA1-mediated lipid transport remains unclear. The analysis with purified protein is useful for characterizing the transport function or substrate specificity of ABCA1 with purified ABCA1. However, the *in vitro* method for evaluating the transport activity has not been developed.

ABCA1 was expressed in FreeStyle 293 cells and purified with anti-FLAG affinity chromatography. Purified ABCA1 was reconstituted in liposomes composed of various lipid compositions, and the ATPase activity was measured. We established the reconstitution, in which the ATPase activity was stimulated in a cholesterol or desmosterol-dependent manner.

ABCA1, cholesterol, liposome

発表責任者：坂田和樹（sakata.kazuki.83a@st.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3J02-09
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:30～ ミーティングルーム J

27-hydroxycholesterol 産生に基づくミトコンドリアへのコレステロール輸送の評価

Assessment of cholesterol transport to the mitochondria based on 27-hydroxycholesterol production

○小澤 光、齋藤 穂高、佐藤 隆一郎、山内 祥生 (東大院・ 農生科・応生化)
○Hikari OZAWA, Hodaka SAITO, Ryuichiro SATO, Yoshio YAMAUCHI (Dept. of Appl. Biol. Chem., Grad. Sch. of Agr. and Life Sci., The Univ. of Tokyo)

コレステロール代謝産物のひとつである 27-Hydroxycholesterol (27HC)は、SREBP-2 の活性を抑制する他､LXR の内因性リガンドとしてその活性を惹起する｡さらに､27HC は selective estrogen receptor modulator 活性も有しており、心血管疾患の促進や乳癌の促進などに関与する。27HC は生体内で多様な生理活性を有しているが、その産生調節機構はほとんど分かっていない。27HC 産生酵素である CYP27A1 はミトコンドリア内膜に局在しており、27HC はミトコンドリアで産生される。一方、ミトコンドリアには細胞コレステロールの 1%弱しか存在しておらず、ミトコンドリアへのコレステロール供給が 27HC 産生に重要な役割を果たしていると考えられる。しかしながら、ミトコンドリアへのコレステロール輸送機序は不明な点が多い。そこで、我々は、27HC の産生を指標としたミトコンドリアへのコレステロール輸送をモニターする評価系を確立し、その輸送機序を明らかにすることを目指している。複数の培養細胞株に CYP27A1 及びミトコンドリアの外膜から内膜へコレステロールを輸送する StAR を発現させ、SREBP-2 標的遺伝子の発現を解析した。その結果、ヒト副腎皮質腺癌由来細胞 SW13 において､これら 2 つのタンパク質の発現に伴う SREBP-2 標的遺伝子の発現低下が認められたことから、この細胞株に CYP27A1 と StAR を発現させ、SREBP-2 標的遺伝子の発現をモニターすることで、27HC の産生が評価できると判断した。現在、薬剤依存的に CYP27A1 と StAR の発現を薬剤依存的にコントロールできるシステムの構築を進めている。

The cholesterol metabolite 27-hydroxycholesterol (27HC) has several physiologically important functions in lipid metabolism including SREBP-2 regulation. 27HC is produced in the mitochondria by CYP27A1, the enzyme in mitochondrial inner membrane. Since the mitochondria contain only less than 1% of cellular cholesterol, cholesterol transport to this organelle plays a crucial role in 27HC biosynthesis. However, the molecular mechanism remains largely unknown. To monitor cholesterol transport to the mitochondria, CYP27A1 and StAR, an intramitochondrial cholesterol transporter, were expressed in several cell lines, and SREBP-2 target gene expression was assessed. Our results suggested that expression of these two proteins and analysis of SREBP-2 target gene expression in SW13 cells enable us to monitor cholesterol transport to the mitochondria.

27-hydroxycholesterol, SREBP-2, mitochondria

講演番号：3J02-10
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:30～ ミーティングルーム J

脂質輸送タンパク質を介したコレステロール恒常性制御

Regulation of cholesterol homeostasis via lipid transfer proteins

○齋藤 穂高、山内 祥生、佐藤 隆一郎（東大院・農生科・応生化）
○Hodaka SAITO, Yoshio YAMAUCHI, Ryuichiro SATO (Dept. of Appl. Biol. Chem., Grad. Sch. of Agr. and Life Sci., The Univ. of Tokyo)

細胞内におけるコレステロール分布は均一ではなく、細胞コレステロールの 70~90%は細胞膜に局在する。それに対し、小胞体には細胞全体の 1%程度のコレステロールしか含まれていない。一方、小胞体には、コレステロール恒常性制御に関与する重要な分子が複数局在している。コレステロール生合成は、小胞体コレステロール量依存的に活性が調節される転写因子 SREBP-2 により包括的に制御される。SREBP-2 は前駆体として小胞体に局在するが、小胞体コレステロール量が減少すると、ゴルジ体へ輸送されて活性型となり、コレステロール生合成関連遺伝子の発現を惹起する。また、細胞内の余剰コレステロールは小胞体に局在するコレステロールエステル化酵素 ACAT1 によってエステル化され、細胞内に貯蓄される。このように、小胞体コレステロール量とコレステロール恒常性制御は密接に関係するため、小胞体コレステロール量は厳密に制御されなければならないが、小胞体コレステロール量調節に関わる分子機構は十分に理解されていない。脂質輸送に関する近年の研究により、オルガネラ間の膜接触部位における脂質輸送に、様々な脂質輸送タンパク質が関与していることが明らかになってきた。そこで我々は、これら脂質輸送タンパク質の内、ステロール結合能を有する oxysterol-binding protein related proteins (ORPs)に着目し、これら分子がコレステロール代謝制御に及ぼす影響について解析を行なった。ORP ファミリータンパク質の内、小胞体からゴルジ体へコレステロールを輸送することが報告されている OSBP に着目したところ、OSBP が SREBP-2 の活性制御に重要な役割を果たしていることが見出された。一方、ORP5 や ORP8 は SREBP-2 活性に影響を及ぼさないことが示された。本発表では、これら成果の詳細について紹介する。

70~90% of cellular cholesterol is localized in the plasma membrane, whereas the endoplasmic reticulum (ER) contains only 1% of it. Nevertheless, most proteins involved in cholesterol homeostatic response are localized in the ER, and their activity is regulated by ER cholesterol. The ER thus plays a vital role in the regulation of cellular cholesterol homeostasis. However, how cells regulate ER cholesterol levels is remained poorly understood. This study focuses on oxysterol-binding protein related proteins (ORPs). We show that OSBP, one of this family proteins, plays an important role in controlling the abundance of ER cholesterol, thus regulating SREBP-2 pathway.

Cholesterol, SREBP-2, OSBP

発表責任者：齋藤穂高（adca1066@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3J02-11
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:30～ ミーティングルーム J

INSIG を介した酸化ステロールによる細胞死誘導機構

INSIG mediated cell death by oxysterols

○渡邉 雄一、三吉 翔子、清水 誠、山内 祥生、佐藤 隆一郎（東大院・農生科・応生化）
○Yuichi WATANABE, Shoko MIYOSHI, Makoto SGIMIZU, Yoshio YAMAUCHI, Ryuichiro SATO
(Dept. of Appl. Biol. Chem., Grad. Sch. of Agric. and Life Sci., Univ. of Tokyo)

INSIG は小胞体膜上で酸化ステロールと結合することで、SREBP 活性制御や HMG-CoA 還元酵素の分解制御を介した脂質代謝調節を担う。INSIG はこれら脂質代謝制御のほか、抗ウイルス機能を有するタンパク質の制御に関わるなど、その機能は多岐にわたる。近年、酸化ステロール 25-Hydoroxycholesterol (25HC)がストレス応答性転写因子 ATF4 タンパク質を増加させ、細胞死を惹起することが報告された。しかし、この誘導メカニズムの詳細は不明であった。

本研究で我々は、Chinese hamster 卵巣由来細胞 CHO-7 並びにその INSIG1/2 欠損株 SRD-15 を用いて、酸化ステロールのうち 25HC を含む INSIG 結合能が高い 3 種の酸化ステロールにより ATF4 の発現が亢進し、さらにこの発現亢進が INSIG の欠損により減弱することを見出した。また、INSIG1 あるいは 2 の発現は SRD-15 で 25HC による ATF4 発現亢進を回復し、過去に報告された INSIG2 の酸化ステロール結合能低下変異体発現では ATF4 発現亢進は回復しなかったことから、25HC は INSIG との結合を介し ATF4 発現を亢進することを見出した。さらに、25HC による ATF4 発現を制御する ER ストレスセンサーPERK の CHO-7 での活性化亢進、PERK ノックダウンによる 25HC 誘導性 ATF4 発現の減弱や、SRD-15 で減弱していた 25HC による PERK 活性化の INSIG 発現による顕著な回復等から、25HC–INSIG 結合は PERK を活性化し ATF4 発現を亢進することを見出した。また、25HC による ATF4 発現はその下流遺伝子のうち CHO-7 においてアポトーシス関連遺伝子発現を選択的に誘導し、一方 SRD-15 においてはこれらの遺伝子の発現亢進は見られなかった。その結果、25HC 処理下における細胞生存率は CHO-7 で顕著に低下したのに対し、SRD-15 においてはほとんど変化しなかった。

本研究結果より、酸化ステロールは INSIG との結合を介して PERK を活性化することにより ATF4 発現を上昇させ、細胞死を誘発することが示唆された。

INSIG is an ER resident protein that is implicated in intracellular lipid metabolism. The oxysterols are oxygenated derivatives of cholesterol and some of them prompt lipid metabolism response through the interaction with INSIG. Certain oxysterols were reported to induce expression of stress-responsive transcription factor ATF4 and lead to cytotoxicity and cell death. Here, we report that this ATF4 expression by oxysterol, especially 25-hydroxycholesterol, is induced by interaction of oxysterol with INSIG *via* PERK activation. Further, induced ATF4 induced pro-apoptotic genes expression and was attenuated in INSIG-deficient cells, followed by inhibition of cell death.

oxysterol, cell death, ATF4

講演番号：3J02-12
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:30～ ミーティングルーム J

ZIP8 媒介金属による細胞内の亜鉛及びマンガンホメオスタシスの撹乱

Disturbance of intracellular zinc and manganese homeostasis by ZIP8-mediated metals

○長松 詩野[1]、西藤 有希奈[1,2]、神戸 大朋[1] ([1]京大院生命、[2]京都薬科大薬)
○ Shino NAGAMATSU[1], Yukina NISHITO[1,2], Taiho KAMBE[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Kyoto Pharmaceutical Univ.)

亜鉛インポーターである ZIP8 は変形性関節症患者の軟骨において高度に誘導され、亜鉛を細胞内に取り込むことが報告されている。亜鉛を特異的に輸送すると考えられてきた ZIP8 だが、その変異が低マンガン血症（グリコシル化異常症）を引き起こすことから、生理条件下ではマンガンを輸送することが明らかになってきている。また、このユニークな特徴に加え、ZIP8 A391T の置換を起こす SNP（rs13107325）は 20 以上もの疾患との関連性を持ち、“多様な疾患に関わる SNPs”のトップ 10 にランクすることが示されていることからも、近年 ZIP8 には大きな注目が集まっている。本研究では、ZIP8 を誘導発現できる系を構築し、ZIP8 の金属輸送認識、及び誘導発現による細胞応答に関して解析を行った。細胞応答因子として、亜鉛レベルでの発現変動が報告されている ZNT1、及び ZNT1 と共に亜鉛制御に関わるメタロチオネイン（MT）を対象とし、解析したところ、ZIP8 の発現下において、外部環境に存在する亜鉛とマンガンの存在量により、ZNT1 と MT の発現が逆の応答を示すことが明らかとなった。ZNT1 の発現がマンガン添加で分解するという知見は、これまでにない全く新しい知見である。また、ZIP8 A391T の発現下ではマンガン添加による ZNT1 の分解は抑制されたため、この SNP がマンガン及び亜鉛ホメオスタシスに大きく影響を与えており、多様な疾患に関与する原因であることが予想される。

ZIP8 has been found to be able to transport manganese as well as zinc. Recently, ZIP8 has received a great deal of attention, because its SNP (rs13107325) that result in A391T substitution has been shown to be associated with more than 20 diseases and to rank in the top 10 of "SNPs involved in pleiotropic diseases". In this study, we established a system that can induce the expression of ZIP8, and analyzed how expression of ZNT1 and metallothionein (MT), both of which are involved in zinc homeostatic regulation, was affected by ZIP8 expression. Accompanying induced expression of ZIP8, ZNT1 and MT expression was increased, while their expression was decreased when low levels of manganese was present. Importantly, the reduction of both proteins was suppressed when ZIP8 A391T was induced, suggesting that the SNP（rs13107325）has a significant impact on zinc and manganese homeostasis, and may be the cause of its involvement in pleiotropic diseases.

ZIP8, zinc, manganese

講演番号：3J02-13
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:30～ ミーティングルーム J

Cryo-EM 解析を目指した脂質輸送型 ABC 蛋白質の生産・調製基盤の構築

Expression and purification of a lipid efflux ABC protein aiming for Cryo-EM analysis

○小段 篤史[1]、光岡 薫[2]、木村 泰久[3]、木岡 紀幸[3]、植田 和光[1]（[1]京大高等研究院 iCeMS、[2]阪大超高圧電顕センター、[3]京大院農）
○Atsushi KODAN[1], Kaoru Mitsuoka[2], Yasuhisa Kimura[3], Noriyuki Kioka[3], Kazumitsu Ueda[1]
([1]Kyoto Univ. KUIAS iCeMS, [2]Osaka Univ. RCUHVEM, [3]Kyoto Univ. Grad. Sch. Agr.)

脂質輸送型 ABC 蛋白質のひとつ ABCA1 は、コレステロールの恒常性維持の鍵を握るトランスポーターであり、ABCA1 の変異は動脈硬化の重要な危険因子である。ABCA1 は、末梢組織に広く発現しており、細胞膜中に過剰に蓄積したコレステロールを、リン脂質とともに血中の脂質アクセプターであるアポリポ蛋白質（アポ A-I）との複合体 HDL（いわゆる善玉コレステロール）として肝臓に送り戻すことで、恒常性を保っている。しかしながら、ABCA1 の作用機構については不明な点が多く残されている。本研究では、ヒト ABCA1 を対象として、蛋白質の生産・調製基盤を構築し、機能状態に近い ABCA1 の Cryo-EM 解析による構造決定を目指す。ヒト ABCA1 をヒト由来の FreeStyle 293 細胞を用いた一過性発現系により発現させ、界面活性剤で可溶化後、FLAG アフィニティー精製とゲル濾過を行い、1L 培養あたり約 0.3 mg の ABCA1 を活性を保った状態で取得できた。この発現系を数十 L 規模にスケールアップし、ミリグラムレベルの ABCA1 蛋白質の生産・調製基盤を構築することに成功した。現在、ABCA1 のナノディスクへの再構成条件の最適化を検討しており、でき次第 Cryo-EM 解析を実施する。

ABCA1, a member of the ATP-binding cassette (ABC) transporter, is widely expressing in the peripheral tissues and playing an important physiological role in cholesterol homeostasis. ABCA1 gene mutations increase the risk of atherosclerosis. ABCA1 is known to transfer cellular cholesterol and phospholipids to apoA-I for generating discoidal HDL particles, thus effluxes excess cholesterol from peripheral cells to the liver. However, the underlying molecular mechanism of ABCA1 remains unknown. We are aiming for structure determination of functional human ABCA1 by cryo-EM. Human ABCA1 protein with C-terminal Flag tags was transiently expressed in a FreeStyle 293 cells, solubilized by a detergent, and purified by FLAG affinity purification and size exclusion chromatography. We established a large scale (milligram level) production and purification system of ABCA1 protein. We are now optimizing the conditions for the reconstruction of ABCA1 into nanodiscs and will perform cryo-EM analysis.

ABC protein, Lipid efflux, Structure-function

発表責任者：小段篤史（kodan.atsushi.4z@kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3J02-14
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:30～ ミーティングルーム J

抗がん剤排出トランスポーターABCG2 のプロテインキナーゼによる発現および機能制御機構の解析
Modulations of expression and activity of anti-cancer drug transporter ABCG2 (BCRP1) by protein kinases

○牧平 実紀、小森 由輝、西出 高大、谷口 友啓、藤井 鈴、三谷 匡、田口 善智（近畿大生物理工遺伝子）
○Minori Makihira, Yuuki Komori, Takahiro Nishide, Tomohiro Taniguchi, Suzu Fujii, Tasuku Mitani, Yoshitomo Taguchi (Kindai Univ.)

【目的】ABCG2 (BCRP1/Breast Cancer Resistance Protein1)は、細胞膜に局在するトランスポータータンパク質で、二量体で機能し、多種の抗がん剤、尿酸などの様々な物質を細胞内から外へ能動輸送する。ABCG2 は、がんの抗がん剤耐性の獲得に関与する他、痛風の発症にも関与することが示されている。さらに、造血幹細胞やマウス由来の ES 細胞などの各種幹細胞において特異的に発現しており、幹細胞が分化するとその発現が低下する。当研究グループにおいて、マウス ES 細胞における ABCG2 の機能を明らかにすることを目的として、この細胞で ABCG2 の細胞内ドメインと相互作用するタンパクを Yeast Two Hybrid 法によって探索した。その結果、2 種類のプロテインキナーゼ（LKB1, MEK1）が ABCG2 と相互作用する候補タンパク質として単離された。この 2 つのプロテインキナーゼが ABCG2 の発現および機能を制御する可能性を検討した。
【方法・結果】マウス由来の Abcg2 の N 末に GFP を融合した GFP-Abcg2 の発現ベクターを構築、その安定発現細胞は ABCG2 の基質である抗がん剤に対して耐性をもつことを確認した。HEK293 細胞への発現ベクターの導入により発現させた GFP-Abcg2 と、FLAG タグを付加したマウス由来の Lkb1 および Mek1 はそれぞれ共免疫沈降した。さらに、発現ベクターの導入により GFP-Abcg2 と、FLAG-Lkb1、FLAG-Mek1、またはそれぞれのキナーゼの変異体を共に安定発現する HEK 細胞を得た。それぞれの共発現細胞における GFP-Abcg2 の発現量，細胞内局在，リン酸化の程度、および細胞の示す抗がん剤に対する耐性度を比較し、これらのプロテインキナーゼがトランスポーターである GFP-Abcg2 の発現、細胞内局在や活性に与える影響についても検討したのであわせて報告する。

ABCG2 (BCRP1 / Breast Cancer Resistance Protein1) is a plasma membrane protein, and actively transports a wide variety of compounds, such as anti-cancer drugs, uric acid, and porphyrins. By the yeast two-hybrid screening to identify proteins that were associated with ABCG2 in mouse ES cells, in which ABCG2 highly expressed, we found two serine/threonine protein kinases, LKB1, a tumor suppressor gene product, and MEK1 (MAPKK1), as potential interacting partners of ABCG2. These two protein kinases were co-immunoprecipitated with ABCG2 when expressed in HEK293 cells. We would also report and discuss the involvement of these two kinases in the modulations of intracellular localization and transport activity of ABCG2.

ABCG2, ABC transporter, protein kinase

発表責任者：田口 善智（taguchi@waka.kindai.ac.jp）

講演番号：3J02-15
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:30～ ミーティングルーム J

GATA2 と PU.1 による粘膜型マスト細胞特異的遺伝子の発現制御機構

The regulation of mucosal mast cell-specific gene expression by GATA2 and PU.1

○井上 真理子、秋元 悠太、長田 和樹、笠倉 和巳、八代 拓也、西山 千春（東理大基工）
○Mariko INOUE, Yuta AKIMOTO, Kazuki NAGATA, Kazumi KASAKURA, Takuya YASHIRO, Chiharu NISHIYAMA (Tokyo Univ. Sci.)

血球系細胞特異的転写因子である GATA2 と PU.1 は、造血系幹細胞からの分化過程で互いに抑制的に働きながら、それぞれ赤血球系列、顆粒球・単球系列の分化や遺伝子発現を誘導する。一方、アレルギーのエフェクター細胞であるマスト細胞ではこれら 2 つの転写因子が共に発現する。私達はこれまで、マスト細胞において GATA2 と PU.1 が協調的に転写活性化する仕組みがあることを報告してきた。マスト細胞には結合組織型と粘膜型の 2 種が存在し、消化管などに局在する粘膜型マスト細胞はプロテアーゼ Mcpt-1, Mcpt-2、インテグリン CD103 を特徴的に発現する。今回、粘膜型マスト細胞の遺伝子発現解析から、GATA2 と PU.1 について新たな相互関係を見出したので報告する。
マウス骨髄由来培養マスト細胞に PU.1 si RNA を導入してノックダウン（KD）を行ったところ、Mcpt1, 2 発現は上昇し、Cd103 発現は減少した。一方、GATA2 KD では Mcpt1,2 発現が低減し、Cd103 発現が顕著に上昇した。この時、PU.1 と GATA2 の発現レベルを確認したところ、PU.1 KD で GATA2 が、GATA2 KD で PU.1 がそれぞれ上昇していた。TGF-β 刺激は Mcpt-1,2,Cd103 の発現をいずれも顕著に増加させたが、ChIP assay の結果、TGF-β 刺激は Mcpt-1,2 遺伝子制御領域の GATA2 結合量を増加させ、一方 Cd103 への PU.1 結合量が GATA2 KD で増加することが明らかとなった。以上から、GATA2 と PU.1 は、マスト細胞中に共存しつつも互いに発現を阻害し合うこと、また、それぞれが細胞特異的遺伝子発現に寄与することが示唆された。
Mast cells (MCs), which play important roles in the allergic responses, express hematopoietic cell-specific transcription factors GATA2 and PU.1, whereas GATA2 and PU.1 suppress each other’s expression during the development of erythroid and granulocyte/monocyte, respectively. MCs are phenotypically divided into two subpopulations, mucosal MCs (MMCs) and connective tissue MCs. In this study, we investigated the mechanism by which MMCs specifically express proteases Mcpt-1, Mcpt-2, and integrin CD103, focusing on GATA2 and PU.1. PU.1 KD using siRNA elevated the expression of Mcpt-1,2 and decreased the expression of CD103, accompanied with upregulation of GATA2, in bone-marrow derived MCs. In contrast, GATA2 KD decreased the expression of Mcpt-1,2 and increased the expression of CD103 and PU.1. TGF-β stimulation markedly induced the expression of Mcpt-1,2 and CD103. ChIP assays showed that TGF-β enhanced the binding of GATA2 to the *Mcpt-1,2* gene and GATA2 KD increased the binding of PU.1 to the *Cd103* gene. Taken together, we suggest that GATA2 and PU.1 contribute to MMC-specific gene expression with inhibiting each other’s expression in MCs.

mucosal mast cells, transcription factors, CD103

講演番号：3J02-16
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:30～ ミーティングルーム J

転写因子 Eomesodermin で促進される IFN-γ発現における NF-κB 経路の役割

A role of the NF-κB pathway on IFN-γ expression promoted by the transcription factor Eomesodermin

○田中 裕美子[1]、中尾 彩香[1]、三宅 靖延[2]、谷垣 里穂[1]、東 幸奈[1]、片岡 孝夫[1]（[1]京都工芸繊維大学・応生、[2]佐賀大学・医）
○Yumiko TANAKA[1], Ayaka NAKAO[1], Yasunobu MIYAKE[2], Riho TANIGAKI[1], Yukina HIGASHI[1], Takao KATAOKA[1] ([1]Dept. Appl. Biol., Kyoto Inst. Tech., [2]Faculty of Med., Saga Univ.)

Interferon-γ (IFN-γ)は、Th1 細胞や細胞傷害性 T 細胞等から産生されるサイトカインであり、免疫応答を調節する働きを持つ。T-box ファミリー転写因子 Eomesodermin (Eomes)は IFN-γ の発現調節に関与している。我々は、マウスリンパ腫由来 BW5147 細胞の Eomes トランスフェクタントにおいて、IκB キナーゼ阻害剤である TPCA-1 および IKK-16 が phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)と ionomycin (IM)によって誘導される IFN-γ 産生を阻害するが、その阻害効果が IL-2 産生と比較して弱いことを見出した。本研究では、マウスリンパ腫由来 EL4 細胞の Eomes トランスフェクタントを樹立し、IFN-γ 産生に対する IKK 阻害剤の作用を検討することによって、IFN-γ 発現における NF-κB 経路の関与を明らかにすることを目的とした。PMA および IM による IL-2 産生は TPCA-1 と IKK-16 によって強力に阻害されたが、IFN-γ 産生は抑制されなかった。次に、PMA および IM 刺激時の Eomes、RelA (NF-κB subunit)、NFATc2 の IFN-γ 遺伝子座への結合を ChIP アッセイによって解析した結果、これらの転写因子は IFN-γ プロモーター領域および特定の CNS に結合することが明らかになった。TPCA-1 は Eomes や NFATc2 の結合には影響を与えなかったが、RelA の結合を顕著に阻害した。さらに、ナイーブ T 細胞を CD3 と CD28 に対する抗体によってブラスト化した後、PMA および IM によって IFN-γ と IL-2 の産生を誘導した。その結果、TPCA-1 と IKK-16 は $CD4^+$ T 細胞と $CD8^+$ T 細胞の IL-2 産生を顕著に阻害したが、IFN-γ 産生をあまり阻害しなかった。以上の結果より、T 細胞では IL-2 発現と比較して、NF-κB 経路は PMA と IM で誘導される IFN-γ 発現に必ずしも必要でないことが示唆された。

Interferon-γ (IFN-γ) is one of cytokines secreted by Th1 cells and cytotoxic T cells, and plays a critical role in the regulation of immune responses. The T-box family transcription factor Eomesodermin (Eomes) is known to promote the IFN-γ expression. In this study, we established Eomes-transfected EL4 cells and investigated the effects of two IκB kinase inhibitors (TPCA-1 and IKK-16) on the IFN-γ expression in response to phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) plus ionomycin (IM) stimulation. TPCA-1 and IKK-16 markedly reduced the expression of IL-2, but not IFN-γ. Eomes, RelA (NF-κB subunit), and NFATc2 interacted with the *Ifng* promoter and specific CNS. TPCA-1 reduced the binding of RelA, but not Eomes and NFATc2 to the *Ifng* promoter and CNS. Moreover, in primary $CD4^+$ T cells and $CD8^+$ T cells, TPCA-1 and IKK-16 inhibited PMA plus IM-induced IL-2 production markedly, but IFN-γ production only weakly. These results suggest that the NF-κB pathway is not necessarily required for PMA plus IM-induced IFN-γ expression in T cells.

Eomesodermin, IFN-γ, NF-κB

講演番号：3J02-17
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:30～ ミーティングルーム J

分泌型ルシフェラーゼを用いた UCP1 レポーター前駆脂肪細胞株の樹立

Establishment of UCP1 reporter preadipocyte line using secreted luciferase

○川原崎 聡子[1]、鄭 惠芬[1]、高橋 春弥[1]、野村 亘[1,2]、神戸 大朋[3]、井上 和生[1]、河田 照雄[1,2]、後藤 剛[1,2] ([1]京大院農・食品生物、[2]京大・生理化学研究ユニット、[3]京大院生命・統合生命)
○Satoko KAWARASAKI[1], Huei-Fen JHENG[1], Haruya TAKAHASHI[1], Wataru NOMURA[1,2], Taiho KAMBE[3], Kazuo INOUE[1], Teruo KAWADA[1,2], Tsuyoshi GOTO[1,2] ([1]Div. of Food Sci. & Biotechnol., Grad. Sch. of Agric., Kyoto Univ., [2]Research Unit for Physiological Chemistry, Kyoto Univ., [3]Kyoto Univ. Biostudy)

【目的】脂肪組織のミトコンドリアに存在する脱共役タンパク質 1 (UCP1) は熱産生を通じてエネルギー消費に寄与することが知られており、UCP1 発現誘導は肥満解消への新たなアプローチとして注目されている。本研究では分泌型ルシフェラーゼを用い、UCP1 転写活性を簡便に評価可能なレポーター前駆脂肪細胞株の樹立を目指した。
【方法・結果】マウス鼠径部白色脂肪組織由来前駆脂肪細胞株の UCP1 プロモーター下流にレポーター遺伝子として高感度な分泌型 NanoLuc (secNLuc) をノックインすることにより細胞株を作製することを試みた。UCP1 ゲノム上のターゲット配列をヌクレアーゼ Cas9 により切断し、secNLuc を含むプラスミド DNA をドナーとして相同組み換えによる修復機構を用いてノックインを行い、さらにネガティブセレクションによりドナーがゲノム上に非特異に組み込まれた細胞を排除した後、得られたクローンを評価した。その結果、想定通りにノックインされた配列を有するクローンを得ることが出来、既知の UCP1 発現誘導化合物を添加した結果、培養上清のルシフェラーゼ活性が有意に上昇した。
【結論】本研究において、分泌型ルシフェラーゼをレポーター遺伝子とする UCP1 転写活性評価系の立ち上げに成功し、作製した前駆脂肪細胞株を用いることで簡便に UCP1 転写活性を評価可能であることが示唆された。本細胞株は UCP1 転写活性を調節する新規因子のスクリーニングに有用であると考えられる。

Mitochondrial UCP1 is responsible for thermogenesis in adipocytes and contributes to energy expenditure, so UCP1 attracts attention as a key factor for obesity prevention. In this study, we aimed at establishing new UCP1 reporter preadipocyte line using secreted luciferase as a reporter gene. We tried to knock-in highly sensitive secreted NanoLuc (secNLuc) into the genome of a murine preadipocyte line using CRISPR/Cas9 system and homologous recombination (HR). To avoid random integration of the donor into genome, we inserted negative selection marker outside of the HR cassette. As a result, we obtained the proper knock-in clone, and after UCP1 inductive stimulation, the conditioned medium from this clone showed higher luciferase activity than unstimulated control. In conclusion, we could easily evaluate *Ucp1* transcriptional activity with this UCP1-secNLuc reporter preadipocyte line.

UCP1, secreted luciferase, reporter preadipocytes

発表責任者：後藤剛（goto.tsuyoshi.6x@kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3J02-18
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 09:30～ ミーティングルーム J

前帯状皮質による海馬活性調節を介する恐怖記憶汎化制御

Regulation of contextual fear memory generalization by anterior cingulate cortex - hippocampus circuit

○長葭 大海、喜田 聡（東大院・農学生命科学・応用生命化学）
○Taikai NAGAYOSHI, Satoshi KIDA (Dept. of Applied Biological Chemistry, Univ. of Tokyo)

心的外傷後ストレス障害（PTSD）はトラウマ記憶を原因とする精神疾患であり、その主症状の一つがトラウマ記憶の汎化であり、類似した手がかり（条件刺激）に遭遇してもトラウマ記憶が想起される。この恐怖記憶汎化を制御する領野として前帯状皮質と海馬が知られているが、恐怖記憶汎化における前帯状皮質と海馬の関係性の解析は進んでいない。本研究では、光遺伝学的手法を用いて恐怖条件づけ文脈記憶の汎化に対する前帯状皮質から海馬に至る神経回路の役割を解析した。チャンバー内でマウスに電気ショックを与え（トレーニング）、この 24 時間後にトレーニング時と同じチャンバー（Context A）、または、異なる（Context B）あるいは類似した（Context C）チャンバーにマウスを入れた（テスト）。アデノ随伴ウイルスを用いて前帯状皮質に光感受性イオンチャネル（ChR2 あるいは ArchT）を発現させて、海馬に光照射し、テスト時の前帯状皮質→海馬回路の活性化及び不活性化の影響を解析した。その結果、この回路を光活性化した場合には対照群と比較して Context B における恐怖（すくみ）反応の増加が観察され、恐怖記憶汎化が促進されることが示唆され、一方、この回路を光不活性化した場合には、対照群と比較して Context C における恐怖反応の減少が観察され、恐怖記憶の汎化が阻害されることが示唆された。以上より、前帯状皮質→海馬回路は恐怖記憶汎化を正に制御することが強く示唆された。

To understand mechanisms for fear generalization at the circuit level, we examined effects of optogenetic activation and inactivation of the anterior cingulate cortex (ACC)→hippocampus (HP) projection pathway on generalization of contextual fear memory. Mice received micro-infusion of adeno-associated virus expressing channelrhodopsin-2 (ChR2) or archaerhodopsin-T (ArchT) under the control of CaMKII promoter into the ACC. Mice were contextual fear-conditioned and 24 hr later, were tested in the conditioned chamber (Context A), novel context (Context B) or similar context (Context C). Optogenetic activation of the ACC→HP pathway at the axon terminals in the HP showed higher freezing in the Context B compared to the control group, whereas this optogenetic inactivation showed lower freezing in the Context C compared to the control group. These results suggested that the ACC→HP projection pathway positively regulates contextual fear generalization.

fear memory, generalization, optogenetics

講演番号：3J04-01
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:30～ ミーティングルーム J

SORBS タンパク質は間葉系幹細胞の未分化状態維持に関わるメフリンの発現量を調節する
SORBS family proteins regulate meflin expression

○高橋 真助[1]、柴原 正和[1]、榎本 篤[2]、木村 泰久[1]、木岡 紀幸[1] ([1]京都大農、[2]名古屋大医)
○Shinsuke TAKAHASHI[1], Masakazu SHIBAHARA[1], Atsushi ENOMOTO[2], Yasuhisa KIMURA[1], Noriyuki KIOKA[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Nagoya Univ.)

メフリン(meflin)は間葉系幹細胞のマーカータンパク質として同定され、間葉系幹細胞の未分化性の維持に働く。また、がん抑制性がん関連線維芽細胞にも特異的に発現し、その機能維持にも必要であることが知られている。メフリンの発現量は細胞外環境の物理的な硬さによって調節されることが知られているが、その詳細なメカニズムは不明なままである。本研究では接着斑に局在し、細胞外環境の硬さ感知と硬さによる間葉系幹細胞の脂肪細胞分化に関与する SORBS ファミリータンパク質に注目し、それらがメフリン発現に与える影響を調べた。その結果、間葉系幹細胞において、CAP(SORBS1)の発現抑制によりメフリンの mRNA 発現量が増加し、逆にビネキシン(SORBS3)の発現抑制によりメフリンの mRNA 発現量が減少した。また、再発現によりそれらの傾向が緩和されることを明らかとした。次に単離接着斑プロテオーム解析により CAP、ビネキシンの発現が接着斑への局在に影響を及ぼす可能性が示唆されたタンパク質 59 種類について、その発現抑制がメフリン発現量に与える影響を調べた。その結果、SORBS ファミリータンパク質の下流でメフリンの発現量を増加させる候補タンパク質 4 種、メフリンの発現量を減少させる候補タンパク質 6 種を同定した。CAP とビネキシンは間葉系幹細胞の分化を逆方向に調節することが知られているため、同定した候補分子、メフリンが CAP、ビネキシンの下流で間葉系幹細胞の分化に与える影響についてさらに詳しく調べる予定である。

Meflin has been identified as a mesenchymal stem cells marker. It maintains undifferentiated state of mesenchymal stem cells. It is also required to maintain cancer-restraining cancer-associated fibroblasts. The expression level of meflin is regulated by the stiffness of extracellular matrix. However, the detailed mechanism remains unclear. In this study, we focused on SORBS family proteins that are localized at focal adhesions and are involved in sensing of the stiffness of extracellular matrix. As a result, it was clarified that CAP (SORBS1) depletion upregulates and Vinexin (SORBS3) depletion downregulates mRNA expression of meflin in mesenchymal stem cells. We also identified 10 candidate proteins that regulate expression of meflin downstream of the Sorbs family proteins. We are investigating the effects of the candidate proteins and meflin on differentiation in mesenchymal stem cells.

Focal adhesion, Differentiation, Mesenchymal stem cells

講演番号：3J04-02
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:30～ ミーティングルーム J

Osteogenetic oligodeoxynucleotide (osteoDN) induces mineralization independently of TLR9

○Yuma Nihashi[1], Mana Miyoshi[2], Koji Umezawa[2,3], Takeshi Shimosato[1,2,3], Tomohide Takaya[1,2,3]
([1]Grad Sch Med Sci Tech, Shinshu Univ, [2]Fac Agr, Shinshu Univ, [3]IBS, Shinshu Univ)

Introduction: Osteoblasts are responsible for bone formation, and its differentiation is indispensable for bone homeostasis. Dysfunction of osteoblast differentiation is one of the causes of osteoporosis. We recently identified the oligodeoxynucleotide named "osteoDN" strongly promotes an early stage of osteoblast differentiation. However, the target of osteoDN is still unclear. Generally, the oligonucleotides having unmethylated CpG motifs (CG) are recognized by Toll-like receptor 9 (TLR9) and initiate immune responses. Since osteoDN has one CG sequence, in this study, we investigated the TLR9-dependency of osteoDN during osteoblast mineralization.

Methods: Mouse osteoblast cell line MC3T3-E1 was induced mineralization for 9-12 days in differentiation medium with 0.1-10 μM osteoDN in the presence or absence of a TLR9 antagonist, E6446. Osteoblast mineralization was evaluated by alizarin staining. Expression levels of osteogenic genes were quantified by qPCR.

Results: 10 μM osteoDN significantly induced transcriptions of osteogenic transcription factors *Runx2* and *Sp7* (osterix), and non-collagenous hormone *Bglap2* (osteocalcin) at 48 h after the treatment. osteoDN significantly increased the alizarin-positive area at day 9 in a dose-dependent manner. These data indicate that osteoDN induces osteoblastic mineralization through activating gene expression. RT-PCR revealed that MC3T3-E1 cells scarcely express TLR9. Pre-treatment of E6446 from 3 h before osteoDN administration did not affect osteoblast mineralization induced by osteoDN. Furthermore, the mutant osteoDN which CG motif is substituted to GC (osteoDN-GC) promoted osteoblast mineralization as well as osteoDN did. It demonstrates that osteoDN facilitates osteoblast maturation in a TLR9-independent manner.

Conclusion: The 18-base single-strand osteoDN promoted osteogenic gene expression and osteoblast mineralization independently of TLR9. It is possible that osteoDN serve as an aptamer depending on its conformation. osteoDN accelerating osteoblast differentiation can be a nucleic acid drug for prevention and therapy for osteoporosis.

osteoblast, osteogenic differentiation, osteogenic oligodeoxynucleotide

講演番号：3J04-03
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:30～ ミーティングルーム J

Myogenetic oligodeoxynucleotide (myoDN) suppresses inhibit adipocyte differentiation

○ Kamino MORIOKA[1], Takakazu MITANI[1], Koji UMEZAWA[1,2], Takeshi SHIMOSATO[1,2], Tomohide TAKAYA[1,2] ([1]Fac Agr, Shinshu Univ, [2]IBS, Shinshu Univ)

Objective: Obesity is a risk factor for diabetes, hypertension, atherosclerosis, and cardiovascular disorders. Obesity is caused by the adipocytes accumulating lipids and enlarging cell size. Adipokines released from mature adipocytes influence the development of metabolic syndrome. Therefore, regulation of adipocyte differentiation is an important subject to prevent obesity and metabolic syndrome. Pre-adipocytes as well as skeletal muscle myoblasts are derived from mesenchymal stem cells. During this process, pre-adipocytes and myoblasts exclusively differentiate each other. Thus, induction of myogenic differentiation generally inhibits adipogenic differentiation. We recently identified the 18-base myogenetic oligodeoxynucleotide (myoDN), iSN04, that promotes muscle differentiation. In this study, we investigated the effect of iSN04 during adipocyte differentiation.
Methods: 3T3-L1 cell line was used as a model of pre-adipocytes. 3T3-L1 cells were induced to differentiate with 30 μM iSN04 for 10 days, then quantified adipocyte differentiation by oil red O staining. Time-course of expression levels of adipogenic genes were quantified by qPCR. To investigate the time point when iSN04 exerts function during adipogenic differentiation, treatment periods of iSN04 were shifted at an interval of 2 days.
Results: The number of mature adipocytes having lipid droplets were significantly decreased by iSN04 treatment for 10 days. iSN04 significantly suppressed the expression levels of adipogenic transcription factors PPARγ and CEBPα, fatty acid binding protein FABP4, and lipid droplet-associated protein perilipin. iSN04 treatment during day 0-2 was critically important to inhibit adipogenic differentiation, while iSN04 treatments after day 2 did not affect lipid accumulation. These data demonstrate that iSN04 works at an early stage of adipocyte differentiation with modulating adipogenic gene expression and eventually inhibit maturation of adipocytes.
Conclusion: This study indicated that iSN04 promoting myogenic differentiation inhibits adipogenic differentiation. iSN04 can be the anti-obese nucleic acid drug targeting pre-adipocytes for preventing metabolic syndrome.

adipocyte differentiation, obesity, myogenetic oligodeoxynucleotide

発表責任者：高谷智英（ttakaya@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：3J04-04
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:30～ ミーティングルーム J

M2 型マクロファージの極性化におけるトランスグルタミナーゼの機能解析

Functional analysis of tissue transglutaminase in M2 macrophage polarization

○篠田 祥希、辰川 英樹、人見 清隆 (名大院創薬科学)
○Yoshiki Shinoda, Hideki Tatsukawa, Kiyotaka Hitomi (Grad Sch Pharm Sci, Nagoya Univ.)

【背景】マクロファージは、感染防御や死細胞除去に関わる M1 型と組織修復や再生を進める M2 型の 2 つのサブタイプに大別される。マクロファージは組織の恒常性維持に重要である一方、異常な活性化は慢性炎症疾患を誘導する。慢性炎症疾患の特徴的な病態である線維化の進行と組織での M2 型マクロファージの誘導には密接な関係があり、同細胞の制御による線維化制御法が研究されている。しかしながら、病態形成におけるマクロファージの誘導機構には不明な点が多く、治療法の開発は難航している。Martinez らはトランスクリプトームおよびプロテオームの相互解析により、ヒトとマウスの M2 型マクロファージに共通してタンパク質架橋化酵素トランスグルタミナーゼ 2（TG2）が発現することを見出した。しかしながら、TG2 と M2 型マクロファージの極性化との関連については未だ解析例がないことから、本研究は M2 極性化における TG2 の機能解明を目的とした。

【方法・結果】マクロファージの M2 極性化と TG2 の発現について相関を検証するため、ヒト単球細胞株およびマウス骨髄細胞から M2 型マクロファージを誘導した結果、極性化に伴う TG2 の発現増加がみられた。TG2 の発現抑制および活性阻害を行うと MRC-1 や CCL22 などの M2 マーカーの発現は顕著に低下した。さらに腎線維化誘導モデルマウスを用いて、病態形成に伴い腎組織内に浸潤するマクロファージを評価したところ、野生型マウスにおいて増加する M2 型マクロファージ（$F4/80^{high}CD11b^{+}MRC\text{-}1^{+}$）は TG2 欠損マウスにおいて有意に減少することが分かった。以上の結果から、TG2 はヒトやマウスマクロファージの M2 極性化において必須因子であることが示唆された。

Macrophages have at least two different polarizations, namely M1- and M2 polarization. These macrophages involve in tissue homeostasis and chronic inflammatory disease. Fibrosis is a pathological feature of chronic inflammatory disease and is exacerbated by M2 macrophages. However, the mechanism of M2 macrophage polarization remains unclear. Martinez *et al.* previously reported that TG2 enhancement in human and mouse M2 macrophages by transcriptomic and proteomic analysis. In this study, we aimed to identify the role of TG2 expression in M2 macrophage polarization. Here, we used human monocyte- and mouse bone marrow-derived macrophages for induction of M2 macrophages. TG2-suppressed and -deficient macrophages markedly showed the less expressions of M2 markers. Moreover, by *in vivo* analysis in the distribution of M2 macrophage into the fibrotic kidney, TG2KO mice showed less amount of $F4/80^{high}CD11b^{+}MRC\text{-}1^{+}$ cells (M2 macrophages). These results indicate that TG2 promote M2 macrophage polarization in both mouse and human.

Macrophage, Transglutaminase, Renal fibrosis

発表責任者：篠田 祥希（shinoda.yoshiki@b.mbox.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：3J04-05
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:30～ ミーティングルーム J

Myogenetic oligodeoxynucleotide (myoDN) suppresses proliferation and induces differentiation of vascular smooth muscle cells

○Mana MIYOSHI[1], Yuma NIHASHI[2], Koji UMEZAWA[1,3], Takeshi SHIMOSATO[1,2,3], Tomohide TAKAYA[1,2,3] ([1]Fac Agr, Shinshu Univ, [2]Grad Sch Med Sci Tech, Shinshu Univ, [3]IBS, Shinshu Univ)

Objective: Arteriosclerosis is a risk factor for cerebral and cardiovascular diseases that are the major causes of death in Japan. At atheroma of atherosclerosis, vascular smooth muscle cells (VSMCs) de-differentiate, migrate into intima, and abnormally proliferate to induce intimal thickening and vascular stenosis. In Moenckeberg arteriosclerosis, VSMCs calcify with a similar process to bone differentiation, which facilitates rupture of vascular structure. Therefore, regulation of VSMC differentiation is an important subject for prevention and therapy for arteriosclerosis. We recently identified the 18-base myogenetic oligodeoxynucleotide (myoDN), iSN04, that promotes skeletal and cardiac muscle differentiation by targeting nuclear phosphoprotein, nucleolin. In this study, we investigated the effect of iSN04 during VSMC differentiation.

Methods: Commercial human aortic SMCs (hAoSMCs) were cultured with 30 μM iSN04. Cell proliferation was examined by EdU staining and differentiation was investigated by qPCR. To study the effect of iSN04 on bone differentiation, murine osteoblast cell line MC3T3-E1 was utilized. The MC3T3-E1 cells induced differentiation with 10 or 30 μM iSN04 were subjected to alkaline phosphatase (ALP) staining to quantify bone differentiation.

Results: EdU staining showed that the ratio of proliferating hAoSMCs were significantly reduced by iSN04 treatment. qPCR results indicate that expression levels of α-actinin (*ACTA2*), SM22-α (*TAGLN*), and caldesmon (*CALD1*) that are differentiation markers for hAoSMCs were significantly upregulated by iSN04. ALP activities of MC3T3-E1 cells were dramatically decreased by iSN04, suggesting the inhibited bone differentiation.

Conclusion: The present study indicated that iSN04 suppresses proliferation and facilitates differentiation of VSMCs not only of skeletal muscle cells. In addition, iSN04 is expected to inhibit calcification of VSMCs because iSN04 downregulated bone differentiation of osteoblasts. iSN04 can be the nucleic acid drug targeting VSMCs to abrogate hyperproliferation in atherosclerosis and calcification in Moenckeberg arteriosclerosis.

arteriosclerosis, myogenetic oligodeoxynucleotide, vascular smooth muscle cell

発表責任者：高谷智英（ttakaya@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：3J04-06
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:30～ ミーティングルーム J

線虫 C. elegans の休眠を制御する短鎖神経ペプチド受容体の探索
Search for short neuropeptide receptors that control diapause in the nematode C. elegans
○小野 真弘[1]、松下 健次郎[2]、松永 洋平[3]、岩﨑 崇[1,2]、河野 強[1,2] ([1]鳥取大学大学院・連農、[2]鳥取大学大学院・持続性、[3]株式会社 SRL)
○Masahiro ONO[1], Kenjiro MATSUSITA[2], Yohei MATSUNAGA[3], Takashi IWASAKI[1,2], Tsuyoshi KAWANO[1,2] ([1]UGSAS, Tottori Univ., [2]GSSS, Tottori Univ., [3]SRL)

休眠は幅広い生物が有する優れた生存戦略の１つである．モデル生物・線虫 *C. elegans* は生育環境の悪化により，一時的に生育を停止し休眠する．頭部感覚神経細胞で受容された環境因子が，下流の TGF-β 様シグナル (リガンド:DAF-7) ならびにインスリン様シグナル(リガンド:DAF-28, INS-35 など)を制御することで通常生育/休眠を決定する．これらのシグナル制御機構の解明に向け,「環境因子に応答して初期発動する短鎖神経ペプチド FLPs (FMRFamide-Like Peptides)などが上記シグナルを制御する」との作業仮説を立てた．数種の *flp* 破壊株が休眠率の変動を示すことを踏まえ, FLP 受容体である NPR (Neuropeptide Receptor), FRPR (FMRFamire Related Peptide Receptor)を精査した．本大会ではスクリーニングにより見出した NPR-15 ならびに FRPR-4 の作用機序について発表する．

休眠誘導条件下で受容体破壊株の休眠率を測定したところ, *npr-15* 破壊株は著しい休眠率上昇を示し, *frpr-4* 破壊株は著しい休眠率低下を示した．レポータータンパクの分泌の変動を解析したところ, *npr-15* 破壊株は DAF-7 ならびに INS-35 の分泌を促進することが明らかとなった．現在, *frpr-4* 破壊株における生育ホルモン（DAF-7, DAF-28, INS-35）の分泌変動を検証している．

Diapause is one of the excellent survival strategies of a wide range of organisms. The model organism *C. elegans* temporarily ceases growth and enters into diapause in a response to deterioration of the growth environments. Head sensory neurons receive environmental factors and then decide normal development/diapause by controlling downstream hormonal signaling, TGF-β-like signaling (ligand: DAF-7) and insulin-like signaling (ligands: DAF-28, INS-35, etc.). To elucidate these signal control mechanisms, we hypothesized that initially activated neuropeptides, such as FLPs (FMRFamide-Like Peptides), control the hormonal signaling. Our previous study demonstrated that disruption of several *flp* genes showed fluctuation of diapause. In the present study, we investigated putative FLP receptors, NPR (Neuropeptide Receptor) and FRPR (FMRFamire Related Peptide Receptor). We here show the regulatory mechanism of NPR-15 and FRPR-4, found by our screen, for relevancy to diapause.

Under diapause-inducing conditions, *npr-15* disruption showed a significant increase in diapause probably due to reduction of DAF-7 and INS-35 secretion. In contrast, *frpr-4* disruption showed a decrease in diapause. We are going to test changes in the secretion of growth hormones by *frpr-4* disruption.

C. elegans, GPCR, larval diapause

講演番号：3J04-07
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:30～ ミーティングルーム J

フタホシコオロギのビタミン E 代謝とビタミン E 欠乏症状

Vitamin E Metabolism and Symptoms of Vitamin E Deficiency in Two-spotted Crickets

○齋藤 紘輔、森田 真由、竹中 麻子（明治大農）
○Kousuke SAITO, Mayu MORITA, Asako TAKENAKA (Meiji Univ.)

【背景】自然界に存在する α-、β-、γ-、δ-tocopherol (Toc) と tocotrienol の 8 種 Vitamin E (VE) 同族体の中で、哺乳類は α-Toc を選択的に体内に保持し、また VE 欠乏により欠乏症状を呈する。昆虫ではショウジョウバエで VE 代謝酵素 CYP の基質特異性により α-Toc の体内濃度が他の同族体より高いとの報告がある。本研究では、フタホシコオロギを用いて昆虫における Toc 同族体の代謝及び VE 欠乏の影響について検討した。【方法・結果】実験 1：3 令コオロギに VE 不含飼料を 1 週間与えた後、α-, γ-, δ-Toc をそれぞれ添加した飼料を 1 週間与えたところ、いずれの同族体も体内に同程度蓄積した。実験 2：3 令コオロギに CYP 阻害剤 Piperonyl Butoxide (PBO) を添加あるいは無添加のビタミン E 不含飼料あるいは α-, γ-, δ-Toc 添加飼料を与えて 1 週間飼育した。VE 不含飼料群での全身トコフェロール濃度低下率は α<γ<δ の順で大きく、PBO による体内濃度低下抑制は γ のみでみられた。VE 欠乏時の体内半減期および CYP による代謝活性が同族体により異なることが示された。実験 3：孵化直後のフタホシコオロギに VE 不含飼料、α-, γ-, δ-Toc をそれぞれ、あるいはすべて添加した飼料を与えて 3 週間飼育した。VE 不含群、δ 添加群では他の群より生存率が低かった。VE 欠乏により孵化後の生存率が低下すること、生存率低下の抑制効果は同族体によって異なることが示された。実験 4：羽化前の 7 令フタホシコオロギに VE 不含飼料あるいは含有飼料を与え、19 日間の飼育後、 5 日間生殖行動を行わせた。羽化までの日数には群間で差がなかったが、累計産卵数は VE 欠乏群で低かった。【結論】フタホシコオロギは摂取した VE 同族体 (α-, γ-, δ-Toc)を同様に体内に保持したが、VE 欠乏時の体内での半減期は α-toc が最も長かった。また、孵化後の生育や産卵数の維持に VE が必要であることが示された。

The purpose of this study was to analyze the difference in metabolism of vitamin E homologues (α-, γ-, δ-tocopherol) and the symptoms of vitamin E deficiency in insects using two-spotted crickets. The results of this study revealed that cricket non-selectively retained the administered VE homologues, but had the longest half-life of α-tocopherol in the body during VE deficiency. In addition, VE was required for growth after hatching and maintenance of the number of eggs laid.

vitamin E, tocopherol, insects

発表責任者：竹中麻子（takenaka@meiji.ac.jp）

講演番号：3J04-08
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:30～ ミーティングルーム J

線虫のビタミン C 生合成経路の同定とビタミン C 新機能の探索

Elucidation of the vitamin C biosynthesis pathway in *Caenorhabditis elegans* and investigation of new functions of vitamin C.

○永田 隆太[1]、青木 優果[1]、苅谷 あゆみ[1]、和田 滉佑[1]、柳本 綾子[1]、原 寛佳[1]、岡本 奈穂[2]、美藤 友博[1,2]、吉田 晋一[3]、石原 亨[1,2]、渡邊 文雄[1,2]、藪田 行哲[1,2] ([1]鳥取大学農学部、[2]鳥取大学大学院連合農学研究科、[3]鳥取県産技センター)
○Ryuta NAGATA[1], Yuka AOKI[1], Ayumi KARIYA[1], Kousuke WADA[1], Ayako YANAGIMOTO[1], Hiroka HARA[1], Naho OKAMOTO[2], Tomohiro BITO[1,2], Shinichi YOSHIDA[3], Atsushi Ishihara[1,2], Humio WATANABE[1,2], Yukinori YABUTA[1,2] ([1]Fac. Agric., Tottori Univ., [2]United. Grad. Sch. of Agric. Sci., Tottori Univ., [3]Tottori Institute of Industrial Technology)

【背景と目的】ビタミン C すなわち L-アスコルビン酸(AsA)は水溶性の抗酸化物質であり，多くの動植物に普遍的に存在する。近年，線虫 *Caenorhabditis elegans* も AsA を生合成することが報告された(Patananan et al., 2015)がその生合成経路は不明であった。我々は線虫の AsA 生合成経路を明らかにすることで AsA の機能解析のモデル生物になり得ると考え，まず始めに D-Glc(1-^{13}C)を線虫に投与し GC-MS を用いて線虫への AsA の ^{13}C の取り込みの解析を行ったところ，線虫の AsA 生合成経路は哺乳動物と類似していることが明らかになった。そこで本実験では，動植物の AsA 前駆体を線虫に投与した場合や，哺乳動物の AsA 生合成に関わる酵素と相同性が高い遺伝子を線虫ゲノムから探索し，これらの遺伝子を発現抑制や欠損させた線虫の AsA 量を測定し，生合成に関わる酵素の同定を試みた。また，AsA 量が低下した線虫の酸化ストレスの影響についても調べた。
【方法】リポソームに植物の AsA 前駆体である L-galactono-1,4-lactone もしくは哺乳動物の前駆体である L-gulono-1,4-lactone を内包したものを線虫に投与し HPLC により AsA 量を測定した。また，哺乳動物の AsA 生合成に関わる Gluconolactonase もしくは，L-gulono-1,4-lactone oxidase のオルソログである E03H4.3 遺伝子の発現を抑制あるいは F54D5.12 遺伝子を破壊した線虫の AsA 量を測定した。
【結果】植物の AsA 前駆体の投与により線虫の AsA 量は変化しなかったが，動物の AsA 前駆体を投与すると，AsA 量はコントロール線虫に対し 143%にまで有意に増加した。また，E03H4.3 遺伝子の発現抑制，F54D5.12 遺伝子の欠損により，コントロール線虫に対し AsA 量はそれぞれ 82.2, 81.1%にまで有意に低下した。以上の結果より，線虫の生合成経路は哺乳動物と類似しており，無脊椎動物の AsA 生合成経路を世界で初めて明らかにすることができた。更に F54D5.12 遺伝子破壊線虫の過酸化脂質量と寿命を N2 線虫と比較したところ，遺伝子破壊線虫では寿命の有意な低下や過酸化脂質量の有意な増加を示し，AsA 量低下により酸化ストレス障害が誘導されていることが示唆された。

L-Ascorbate (AsA), also known as vitamin C, is a typical antioxidant. Recently, it has been reported that the nematode *Caenorhabditis elegans* can synthesize AsA (Patananan et al., 2015). However, its biosynthetic pathway was not clearly understood. Therefore, in our experiment, we attempted to elucidate its AsA biosynthetic pathway. Our results indicated that the AsA biosynthetic pathway in *C. elegans* is similar to mammalian's pathway. Furthermore, we showed that the lifespan and malondialdehyde level in the *C. elegans* worms having reduced AsA level significantly reduce and increase compared to those in the N2 worms.

L-ascorbate (AsA), biosynthetic pathway, *Caenorhabditis elegans*

発表責任者：永田隆太（b17a5143u@edu.tottori-u.ac.jp）

講演番号：3J04-09
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:30～ ミーティングルーム J

ネコ腎臓に蓄積する特異な分岐脂肪酸を有するトリグリセリドの発見

Identification of triglycerides with unusual branched fatty acids in cat kidneys.

○市沢 翔太、上野山 怜子、宮崎 雅雄 (岩手大農)
○Shouta ICHIZAWA, Reiko UENOYAMA, Masao MIYAZAKI (Iwate Univ.)

通常、脂肪肝のように臓器に脂質が蓄積している状態は病的で代謝異常などの原因になり得る。しかし臓器に大量の脂質を蓄積していながらも病気にならず、むしろそれが生理的であるという動物がいる。それはネコである。ネコ腎臓の近位曲尿細管の尿細管上皮細胞には多くの脂肪滴が蓄積しており、ネコの腎臓は黄色味を帯びている。我々の先行研究によりネコの尿中には他の哺乳動物では認められないメチルやエチルを有する分岐脂肪酸が多く排泄されていることが明らかになっている。しかし、ネコの尿に排泄される分岐脂肪酸が腎臓に蓄積する脂肪滴に由来するものなのか、またその生合成機構については未解明である。本研究では、ネコ腎臓に蓄積する脂肪滴が分岐脂肪酸で構成されているか、また分岐脂肪酸の生合成が性成熟と関連するか明らかにすることを目的とした。まず腎臓脂肪滴が分岐脂肪酸を含むか調べるため、成ネコの腎臓から Folch 法により全脂質を抽出し、シリカゲルカラムを用いた順相液体クロマトグラフィーを行い分画した。トリグリセリド画分と遊離脂肪酸画分をそれぞれ誘導体化してガスクロマトグラフ質量分析計（GC/MS）で脂肪酸の分子種を解析した。その結果ネコ尿と同じ分岐脂肪酸は腎臓のトリグリセリド画分でのみ検出され、遊離脂肪酸画分からは検出されなかった。次に、分岐脂肪酸の生合成と性成熟との関連を調べるため、成ネコと生後 1 か月齢の仔ネコの尿から Bligh&Dyer 法で脂質を抽出し、誘導体化して GC/MS で脂肪酸の分子種を解析した。その結果、成ネコで検出された分岐脂肪酸が仔ネコでは検出されなかった。以上の結果、分岐脂肪酸は腎臓ではトリグリセリドの一部として存在していることが分かり、これがネコ特異的に腎臓に蓄積している脂肪滴の成分である可能性が示唆された。また、分岐脂肪酸は性成熟前の仔ネコではほとんど生合成されていない可能性が示唆された。

Kidneys of domestic cats accumulate many lipid droplets under physiological conditions. Our previous study found that the feline urine contains abnormal branched fatty acids (BFA) which is not detected in mammals other than cats. However, little is known whether these BFAs are derived from the lipid droplets of feline kidneys and these biosynthetic mechanisms yet. In this study, we carried out chemical analyses of lipids extracted from feline kidneys and immature cat urine by GC/MS. The BFAs were detectable in the fraction containing triglycerides but not in the fraction containing free fatty acids in the kidney. The BFAs were not detected in the urine of immature cats under one month-old in contrast to mature cats. These results reveal that lipid droplets accumulated in feline kidneys may be origins of urinary BFAs in an age-dependent manner.

Cat, Kidney, Lipid droplets

講演番号：3J04-10
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:30～ ミーティングルーム J

ネコのマタタビへの擦り付け行動は蚊の化学防除を可能にする
The characteristic face-rubbing of domestic cats to silver vine leaves allows them to gain chemical pest control against mosquitoes

○上野山 怜子[1]、宮崎 珠子[1]、Jane L. Hurst[2]、Robert J. Beynon[2]、安立 昌篤[3,4]、小野田 伊吹[3]、西川 俊夫[3]、宮崎 雅雄[1] ([1]岩手大院総合科学、[2]University of Liverpool、[3]名古屋大院生命農学、[4]東北大院薬)
○Reiko UENOYAMA[1], Tamako MIYAZAKI[1], Jane L. HURST[2], Robert J. BEYNON[2], Masaatsu ADACHI[3,4], Ibuki ONODA[3], Toshio NISHIKAWA[3], Masao MIYAZAKI[1] ([1]Iwate Univ., [2]Univ. of Liverpool, [3]Nagoya Univ., [4]Tohoku Univ.)

ネコをはじめとしたネコ科動物は、マタタビ葉の匂いを嗅ぐと顔や頭を擦り付け地面に転げ回る特異な行動を見せる。我々は最近マタタビからネコに対する強力な活性物質ネペタラクトールを同定したが、なぜネコがこの化合物に反応するか、その行動意義については未解明であった。そこで本研究では、マタタビ反応の機能的意義の解明を目的とした。ネペタラクトールに類似した構造を持つ化合物が蚊の忌避活性を有するという報告から、ネコのマタタビ葉に対する顔の擦り付けはネペタラクトールを被毛に付着させ、害虫である蚊を忌避する行動であるという仮説を立てた。まずネペタラクトールが蚊の忌避活性を有するか検証するため、ネペタラクトールとマタタビ葉をヒトスジシマカに提示した。その結果、これらの刺激物はコントロールと比較して有意に蚊を忌避することが分かった。次に擦り付け行動の重要性を調べるためにネペタラクトールの染み込んだ濾紙を壁や天井に提示すると、ネコはネペタラクトールに対し顔や頭を擦り付けたが地面に転がらず、マタタビ反応において重要な行動は活性物質を顔や頭の被毛に擦り付け付着させる行動であると分かった。最後にネペタラクトールの付着が蚊の忌避に有効か検証するため、ネペタラクトールを塗布したネコとマタタビ葉に反応後のネコを麻酔して頭部のみを蚊の入ったケージ内に入れたところ、同時に入れたコントロールのネコと比較して頭部に止まる蚊の数が有意に減少した。以上よりネコがマタタビ葉へ顔や頭を擦り付ける反応は、被毛に蚊の忌避剤であるネペタラクトールを付着させることで蚊への化学防除を可能にする行動であると明らかとなった。

Domestic cats rub their faces and heads against silver vine leaves and roll on the ground. While we identified nepetalactol from the leaves as the potent bioactive compound, the biological significance of this response is not yet understood. This study aimed to elucidate the functional significance of this feline enigmatic response. Based on previous reports that an analog of nepetalactol has mosquito-repellent activity, we hypothesized that the rubbing against silver vine leaves is the functional behavior that allows cats to transfer nepetalactol with mosquito-repellent activity. Mosquitoes significantly avoided nepetalactol and silver vine leaves. Rubbing was the most important behavior in the silver vine response, which allows cats to transfer nepetalactol from nepetalactol-source on to cat’s fur. Cats treated with nepetalactol and cats that had rubbed against silver vine leaves were significantly avoided by mosquito-landing compared to control cats. These results are evidence that the characteristic face-rubbing functions to transfer nepetalactol that provide mosquito repellency to cats.

animal behavior, plant, chemical communication

講演番号：3J04-11
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:30～ ミーティングルーム J

発情期の雌イヌの尿中に排出される性フェロモンの探索

Study on canine sex pheromone excreted into estrous female urine

○小野澤 麗、上野山 怜子、宮崎 珠子、宮崎 雅雄 (岩手大学)
○Urara ONOZAWA, Reiko UENOYAMA, Tamako MIYAZAKI, Masao MIYAZAKI (Iwate Univ.)

多くの哺乳動物の繁殖行動に性フェロモンが関与すると考えられている。しかし性フェロモンが単離・同定された例は齧歯類やブタなどに限られており、その全容はよく分かっていない。我々の伴侶動物であるイヌ(*Canis lupus familiaris*)も性フェロモンの化学構造やその機能が未だに解明されていない動物の一種である。雌イヌは季節の影響を受けず 5～12 ヶ月の間隔で年に一、二回約 20 日間発情する。雄イヌはこの発情期間中の雌イヌにだけとても興味を示し、交配を試みる。以前よりこの現象には、発情雌イヌの尿や膣粘液に分泌される性フェロモンが関与していることが示唆されている。1970 年代にはイヌの膣粘液からパラヒドロキシ安息香酸メチルが性フェロモンであると報告された。しかし近年、発情雌イヌの分泌物からこの化合物が検出されず、イヌの性フェロモンに関する研究は振り出しに戻ってしまった。そこで本研究では発情期の雌イヌの尿に着目し、尿の生物活性とそこから放出される揮発性化合物の化学組成について調べた。まず発情期・非発情期の雌イヌの尿を雄イヌに提示して行動観察を行った。その結果、雄イヌは発情期の雌イヌの尿に対してのみ舐めて口をパクパク動かす特異的な行動を示すことが分かった。これは発情期の雌イヌの尿に含まれている性フェロモンを雄イヌが口から切歯管を介して鋤鼻器と呼ばれる化学受容器に取り込むための行動と考えられた。次に発情雌イヌの尿から揮発する化合物の成分について解析した。非発情期と発情開始から発情終了まで雌イヌの尿を毎日採取し、その揮発成分を Tenax 管に捕集し、これを加熱脱着ガスクロマトグラフ質量分析計で分析した。発情期に検出された化合物数は非発情期に検出された化合物数より多い傾向があった。以上の結果、発情雌イヌの尿中に雄イヌに特異的な行動を誘起する性フェロモンが存在し、それは発情期に増加する化合物群の中に含まれている可能性があると示唆された。

Female dogs (*Canis lupus familiaris*) exhibit estrus for 20 days once or twice per year when male dogs show interest to the females and mating behavior. This study aimed to identify sex pheromones in female dogs. We firstly carried out behavioral analysis of male dogs toward estrous and diestrous urine. Male dogs exhibited the characteristic response comprising licking and mumbling the estrous urine, but not the diestrous urine. Chemical compositions of headspace of female the urines were analyzed by gas-chromatograph-mass spectrometry. Numbers of compounds were larger in the estrous urine than the diestrous urine. These results suggest that estrous urine contains sex pheromones in dogs.

canine, urine, sex pheromones

講演番号：3J04-12
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:30～ ミーティングルーム J

ヒトおよびマウス骨格筋由来細胞外小胞のプロテオミクス解析

Proteomic profiling of extracellular vesicles secreted from human and mouse myocytes

○渡辺 祥[1]、須藤 優里[1]、櫻井 英俊[2]、佐藤 隆一郎[1]、山内 祥生[1]([1]東大院・農生科・応生化、[2]京大・CiRA)
○Sho WATANABE[1], Yuri SUDO[1], Hidetoshi SAKURAI[2], Ryuichiro SATO[1], Yoshio YAMAUCHI[1]
([1]Grad. Sch. Agric. and Life Sci., Tokyo Univ., [2]CiRA, Kyoto Univ.)

細胞外小胞（Extracellular vesicle, EVs）は様々な生理活性分子を含んでおり、細胞間・組織間の情報伝達に重要な役割を果たしている。近年、骨格筋細胞においても EVs の分泌が認められ、生理的に重要な役割を果たしていることが示唆されている。しかしながら、生体内においては様々な細胞や組織に由来する EVs が混在するため、骨格筋から分泌された EVs を特定することは困難である。そこで、本研究ではマウス骨格筋細胞 C2C12 及びヒト iPS 細胞由来骨格筋細胞を用いて、これら骨格筋細胞が分泌する EVs のプロテオミクス解析を行った。その結果、骨格筋特異的に発現する複数のタンパク質が同定され、これらのタンパク質が骨格筋由来 EVs のマーカーとして利用できると考えられた。本発表では、マウスの血液や骨格筋間質液を用いて、骨格筋が EVs を分泌するか *in vivo* で検証した結果について報告する。

Extracellular vesicles (EVs) contain a variety of bioactive molecules including nucleic acids, proteins, and lipids. They play important roles in cell-cell communications. Recently, secretion of EVs have been observed in skeletal muscle cells, and its physiological functions have been suggested. However, identifying muscle-derived EVs *in vivo* is nearly impossible because not only skeletal muscle but also other tissues release EVs. In this study, we performed proteomic analysis of EVs released from mouse C2C12 myotubes and human iPS-derived myocytes to identify potential skeletal muscle-specific EV markers. We identified several proteins that are selectively and/or highly expressed in the skeletal muscle. Therefore, these proteins could serve as potential markers for skeletal muscle-derived EVs. We are attempting to verify whether these proteins can serve as markers for skeletal muscle EVs *in vivo*.

Extracellular vesicle, Skeletal muscle, Proteomics

発表責任者：渡辺祥（watanabe-sho650@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3J04-13
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:30～ ミーティングルーム J

家畜用プロバイオティクス *Bacillus hisashii* を給与した豚におけるプロテオーム解析
Proteome analysis of muscle tissue of pigs administered with *Bacillus hisashii*

○岡本 拓也[1]、鷺 陽香[1]、西内 巧[2]、宮本 浩邦[1,3,4]、佐藤 成樹[5]、児玉 浩明[1] ([1]千葉大院・園芸、[2]金沢大・学際、[3]サーマス、[4]理研・IMS、[5]千葉大院・理学)
○TAKUYA OKAMOTO[1], HARUKA SAGI[1], TAKUMI NISHIUCHI[2], HIROKUNI MIYAMOTO[1,3,4], NARUKI SATO[5], HIROAKI KODAMA[1] ([1]Grad. Sch. Horticulture., Chiba Univ., [2]ASRC., Kanazawa Univ., [3]Sermas., [4]RIKEN IMS., [5]Grad. Sch. Science., Chiba Univ.)

【背景・目的】小魚や小エビなどの未利用海産資源を好熱菌群によって発酵させた資材（以下、好熱菌発酵産物）を含む飼料をブタに給与すると、腸内細菌叢に変化をもたらし、子豚の成長促進や母豚の死産率の低下、脂肪蓄積の減少、肉中の遊離アミノ酸の増加など、様々な有益な効果が確認されている。また、好熱菌発酵産物から単離され、家畜用プロバイオティクスとして上市されている *Bacillus hisashii* N-11 株においても同様の効果が得られた。このことから N-11 株には宿主動物の脂質代謝や筋肉組織に影響を与える効果が示唆された。そのため、本研究では N-11 株給与による豚の肉質の変化に着目し、筋肉組織で発現しているタンパク質の構成を明らかにすることを目的とした。
【方法】三元交配豚である LDB と LDK の２種類の系統を対象とした。LDB と LDK 各々に通常飼料を給与したコントロール区、N-11 株を含む飼料を給与した試験区から、半棘筋を採取し、ショットガンプロテオーム解析を実施した。
【結果・考察】プロテオーム解析によって、系統や飼育環境の違いによらず、N-11 株を含む飼料の給与によって共通して変動するタンパク質が同定できた。特に、脂肪滴の膜上に局在し、脂肪や酸化に関与する Perilipin-5 が N-11 株給与によって減少していた。Perilipin-5 は欠損によって脂肪滴が減少することや、細胞の酸化ストレスによって発現が誘導されることが報告されている。そのため、N-11 株給与による筋組織での過酸化脂質や脂肪の減少に Perilipin-5 の減少が関与していると示唆された。

Oral administration of a thermophilic probiotic bacterium, *Bacillus hisashii*, improve the pig health, and decrease of fat content in the muscle was observed. Here, we carried out the proteome analysis of semispinalis muscle after feeding of *B. hisashii* to two kinds of pig breeds (LDB and LDK). Interestingly, the level of perilipin-5 (PLIN5) was decreased in both breeds after feeding of *B. hisashii*. PLIN5 is important for lipid storage and lipid droplet formation, suggesting that decreased level of PLIN5 is associated with the decreased fat contents in the muscle after feeding with *B. hisashii*.

Perilipin-5, *Bacillus hisashii*, Proteome analysis

講演番号：3J04-14
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:30～ ミーティングルーム J

細胞質硫酸転移酵素の核内受容体応答に対する網羅的な発現定量解析

Comprehensive quantitative analysis of cytosolic sulfotransferases for nuclear receptor response

○黒木 勝久[1]、玉井 健一郎[1]、大田 輝[1]、眞鍋 曜子[1]、Liu Ming-Cheh[2]、水光 正仁[1]、榊原 陽一[1]
([1]宮崎大農、[2]トレド大薬)
○ Katsuhisa KUROGI[1], Kenichiro TAMAI[1], Akira OTA[1], Yoko MANABE[1], Ming-Cheh Liu[2], Masahito SUIKO[1], Yoichi SAKAKIBARA[1] ([1]Univ. Miyazaki, [2]Univ. Toledo)

低分子化合物の代謝に関わる抱合反応である硫酸化は、薬物や食品成分、内分泌ホルモンなどの生理活性を制御する反応である。硫酸化を触媒する酵素は遺伝子スーパーファミリーを形成しており、13 種の硫酸転移酵素遺伝子がヒトに存在している。それぞれの酵素は様々な細胞応答に付随して発現変動しているが、これまでの研究では個別にその発現変動が遺伝子レベルで研究されてきている。

そこで本研究では、核内受容体応答による硫酸転移酵素のタンパク質発現を網羅的に解析する目的で、定量質量分析法である MRM(Multiple Reaction Monitoring)法による発現定量解析を行った。

安定同位体標識ペプチドを用いた SULT1A1 から SULT2B1 までの 10 種類の硫酸転移酵素の相対発現定量解析法を確立後、ヒト肝がん由来細胞である HepG2 に FXR を始めとした 8 種の核内受容体リガンドを作用した。タンパク質溶液をペプチドに消化後、MRM 法による硫酸転移酵素の発現変動を解析した。SULT1A1, SULT1A3, SULT1E1, SULT2A1, SULT2B1 などの内分泌ホルモンの硫酸化に関わる SULT の発現変動を網羅的に解析することに成功した。本研究により、生体内ホルモン応答によって発現変動する硫酸転移酵素を統合的に理解することが可能となり、硫酸化による代謝の生理機能解明に繋がることが期待される。

Sulfation, a sulfate conjugation, plays a pivotal role in the regulation of physiologically active compounds including drugs, food components, as well as endocrine hormones. Cytosolic sulfotransferases (SULTs), responsible enzymes for the metabolic sulfation, constitute a gene super family. In humans, thirteen intact SULT genes are identified. SULT isoforms are expressed in response to a variety of cellular responses. Differential expressions of SULT isoforms have been investigated individually.

In this study, comprehensive quantification of SULT isoforms were performed in order to understand the integrated response of SULTs to the nuclear receptors by multiple Reaction Monitoring (MRM).

Relative expression levels of ten distinct SULTs were analyzed in HepG2 treated with eight nuclear receptor ligands. A variety of nuclear receptors, including FXR and LXR, altered the expression of SULTs. These results suggested that comprehensive quantitative analysis using MRM may help us to understand the physiological role of sulfation.

Sulfotransferase, Nuclear receptor, MRM

発表責任者：黒木勝久（katsu1982@cc.miyazaki-u.ac.jp）

講演番号：3J04-15
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 10:30～ ミーティングルーム J

N-ミリストイル化依存的にミトコンドリアに特異的に局在する N-ミリストイル化タンパク質の探索
Identification of N-myristoylated protein specifically localized to mitochondria by protein N-myristoylation

○原田 春菜[1]、七田 真由[1]、守屋 康子[1]、小渕 浩嗣[2]、内海 俊彦[1]([1]山口大院創成科、[2]岡山大院医歯薬総合)
○Haruna HARADA[1], Mayu SHICHITA[1], Koko MORIYA[1], Hirotsugu KOBUCHI[2], Toshihiko UTSUMI[1] ([1]Yamaguchi Univ., [2]Okayama Univ.)

[目的] タンパク質 N-ミリストイル化は、炭素数 14 の飽和脂肪酸であるミリスチン酸が開始メチオニンの脱離後に露出する 2 位のグリシン残基にアミド結合を介して結合する真核生物特有の翻訳後修飾であり、主として細胞質タンパク質に生じることが知られている。我々は、UniProt に収集されたヒト全タンパク質の N 末端アミノ酸配列情報を基に、ヒト N-ミリストイル化タンパク質の網羅的同定を行った結果、多数の新規 N-ミリストイル化タンパク質を見出し、これらのうちミトコンドリア外膜タンパク質である SAMM50 が N-ミリストイル化依存的にミトコンドリアに局在することを見出した。本研究では N-ミリストイル化依存的にミトコンドリアに局在するヒト N-ミリストイル化タンパク質の同定を目的として、ミトコンドリアタンパク質のデータベース Mitoproteome のアミノ酸配列情報を基に、ミトコンドリアに局在するヒト N-ミリストイル化タンパク質の探索を試みた。
[方法・結果] Mitoproteome に収集された 1663 個のタンパク質の中から、N 末端 Met-Gly 配列を持つタンパク質を見出し、全ヒトタンパク質から見出した N-ミリストイル化タンパク質候補と照合した結果、29 個のミトコンドリアに局在する N-ミリストイル化タンパク質候補を見出した。これらのタンパク質について、その C 末端に FLAG-tag を付加した野生型(WT)cDNA、および N-ミリストイル化を阻害した変異体(G2A 変異体)cDNA を作成し、これらの cDNA を COS-1 細胞に遺伝子導入し、代謝標識実験により N-ミリストイル化を、免疫蛍光染色法により細胞内局在を検討した。その結果、呼吸鎖複合体 I の assembly factor である NDUFB7 が効率良く N-ミリストイル化され、この N-ミリストイル化に依存して NDUFB7 がミトコンドリアに特異的に局在することが明らかになった。NDUFB7 は呼吸鎖複合体 I の形成に必須のタンパク質であることから、N-ミリストイル化がヒトのミトコンドリア呼吸鎖複合体の形成に重要な役割を担っていることが示された。

In this study, we searched for human N-myristoylated protein specifically localized to mitochondria by protein N-myristoylation from Mitoproteome, a database of all human mitochondrial proteins. As a result, NDUFB7, an assembly factor of respiratory chain complex I, was found to be efficiently N-myristoylated. It was also revealed that protein N-myristoylation is required for the specific mitochondrial targeting of NDUFB7.

N-myristoylation, mitochondria, localization

講演番号：3J07-01
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:30～ ミーティングルーム J

細胞内のアクチン繊維形成は THz 光照射によって促進される

Intracellular actin polymerization reaction is facilitated by THz irradiation

○細木 亮輔[1]、山崎 祥他[2]、上野 佑也[1]、保科 宏道[2]、小川 雄一[3]、原田 昌彦[1] ([1]東北大農、[2]理研、[3]京大農)
○ryosuke HOSOKI[1], shota YAMAZAKI[2], yuya UENO[1], hiromichi HOSHINA[2], yuichi OGAWA[3], masahiko HARATA[1] ([1]Tohoku Univ., [2]RIKEN, [3]Kyoto Univ.)

細胞内でアクチンは単量体、あるいは繊維として存在する。細胞質のアクチン繊維は細胞増殖や分裂、運動など様々な細胞機能に寄与し、また細胞核のアクチン繊維はゲノム機能制御に関与する。また、人為的にアクチン繊維の形成を制御する手法については、アクチンに作用する化合物を用いた化学的方法が数多く報告されている。我々は、テラヘルツ(THz)周波数帯の光照射を利用した物理的方法が、アクチン繊維形成を操作する新たな手法となるかを検討している。THz 周波数帯は光と電波の中間に位置し、その波長は高分子内の分子間結合に相当する。そのため、THz 光照射により高分子の構造変換が誘起される可能性が示されていた。これまでに我々は、高強度 THz 光照射が、精製アクチンの *in vitro* 重合反応を活性化することを報告している(1)。そこで本研究では、生細胞内のアクチン繊維に対する THz 光照射の影響を解析した。細胞内のアクチン繊維を蛍光プローブで可視化し、THz 光照射による影響を経時的に蛍光顕微鏡下で観察した。その結果、THz 光照射により、アクチン重合促進薬剤 Jasplakinolide と類似したアクチン繊維形成促進が観察された。この結果は、THz 光照射が、細胞内のアクチン繊維形成を操作する新たな物理的手法となることを示唆している。

Monomeric and polymerized filamentous are the functional structures of actin in cells. The actin filaments play essential roles in cytoplasmic and nuclear functions. For understanding and regulating these cellular functions, various chemical compounds have been developed for manipulating actin polymerization. We have investigated terahertz (THz) waves as a physical method of controlling actin polymerization. The wave-length of THz is close to the intermolecular vibration of the protein molecules. Therefore, the excitation of THz waves is expected to induce intermolecular conformational changes.

Recently, we found that THz irradiation activates the polymerization reaction of purified actin *in vitro*(1).

Here we analyzed the effects of THz irradiation on actin filaments in living cells, by fluorescent microscopy.

We showed that THz irradiation increased actin filaments in the cells as well as Jasplakinolide treatment, which is a well-known enhancer of actin polymerization.

This result suggests that THz irradiation is applicable for a novel physical methods to manipulate actin filamets in living cells.

Reference

1, Yamazaki S, Harata M, Idehara T, Konagaya K, Yokoyama G, Hoshina H, Ogawa Y, Sci Rep, 8: 9990, 2018.

Actin, Terahertz(THz)

講演番号：3J07-02
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:30～ ミーティングルーム J

化学誘導性二量体化を用いた PIP5K の接着斑一過的局在化システムの開発

A system for transient PIP5K localization to focal adhesion using chemically induced dimerization

○増元 亮裕、木村 泰久、木岡 紀幸（京都大学）
○Akihiro MASUMOTO, Yasuhisa KIMURA, Noriyuki KIOKA (Kyoto Univ.)

動物細胞は細胞外マトリックス(ECM)に囲まれて存在し、細胞は ECM の性質に応じて分化や遊走能等を変化させる。細胞は接着斑(Focal Adhesion: FA)と呼ばれるタンパク質複合体を介して ECM と結合し、FA によって ECM の性質を感知している。当研究室では FA 近傍の細胞膜がラフト様の特殊な脂質組成である事を示しており、FA 近傍の脂質組成が、FA による ECM の性質感知と細胞機能の調節に重要な役割を持つと考えている。FA の脂質組成の生理的な役割を調べるには、膜脂質を修飾する酵素を FA 近傍に局在化させ、FA 近傍の脂質組成のみを局所的に変化させ、その影響を調べることが有用である。

これまでに、ジベレリン代謝物 GA_3 の添加によりタンパク質 GID1 と GAI が結合することを利用したシステムである「化学誘導性二量体化(Chemically Induced Dimerization)」を用いて、タンパク質を FA に局在化させる実験系を確立している。本実験では上記の実験系を利用し、ホスファチジルイノシトール 4-リン酸 5-キナーゼ(PIP5K)の FA への一過的な局在化を試みた。PIP5K は FA で機能する膜脂質ホスファチジルイノシトール-4,5-ビスリン酸(PIP_2) を産生する酵素で、PIP5K を FA に局在化することで、FA 近傍で PIP_2 が増加することが期待される。

先ず、PIP5K の FA 局在シグナルを欠損した PIP5K 変異体を作製した。次に、PIP5K 変異体・蛍光タンパク質・GID1 の融合タンパク質を作製し、FA 局在 GAI とともにマウス胎児線維芽細胞で発現させた。この細胞に GA_3 を添加し、PIP5K 変異体-YFP-GID1 の蛍光を共焦点顕微鏡で観察した。その結果、GA_3 添加以前は細胞質全体に存在していた PIP5K 変異体が、GA_3 添加 12 分後には FA へと集積している様子が観察された。このように PIP5K の FA 局在化に成功したため、今後は PIP5K の局在化が FA の機能に与える影響を評価する予定である。

Cells regulate their differentiation and migration depending on the stiffness and variety of the extracellular matrix (ECM). Cells sense ECM property through focal adhesions (FAs) formed in cell-ECM adhesion sites. Recent studies show that FA membrane is different from other plasma membrane. We hypothesize that the lipid composition of FA membrane is important for sensing ECM property. In order to test this hypothesis, it is necessary to manipulate the lipid composition of FA membrane and observe its effect on FAs and cells. Our previous study has established an experimental system for transient protein localization to FAs using Chemically Induced Dimerization. Using this system, we succeeded in recruiting phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase (PIP5K) to FAs to manipulate the lipid composition in this study.

Focal Adhesion, Chemically Induced Dimerization, Plasma Membrane

発表責任者：増元　亮裕（masumoto.akihiro.65u@st.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3J07-03
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:30～ ミーティングルーム J

細胞の細胞外マトリックスの硬さ感知に関与する新規タンパク質の同定

The identification of new focal adhesion proteins that are related with mechanosensing

○田辺 修平、柴原 正和、立花 大、木村 泰久、木岡 紀幸（京都大院農）
○ Shuhei TANABE, Masakazu SHIBAHARA, Hiroshi TACHIBANA, Yasuhisa KIMURA, Noriyuki KIOKA (Kyoto Univ.)

細胞は接着斑と呼ばれるタンパク質複合体を介して細胞外マトリックス(以下、基質)に接着し、その硬さが遊走速度や分化方向に影響を与えることが分かってきている。また、基質の硬さが変われば、接着斑に濃縮するタンパク質も変化することが分かっている。当研究室では、接着斑に局在するタンパク質である vinexin α 及び CAP がそれぞれ、硬い基質上での細胞遊走の促進や脂肪細胞分化の抑制に必要であることを見出し、vinexin α 及び CAP は基質の硬さ感知に重要な因子であることを明らかにしている。本研究では、vinexin α 及び CAP と協調して、あるいはその下流で働いている分子を明らかにし、細胞の硬さ感知のメカニズムを解明することを目的としている。

vinexin α 及び CAP をノックアウトしたマウス胎児繊維芽細胞とそれぞれの発現を回復させた細胞を、フィブロネクチンでコートしたプレート上に接着させ、低張液処理と超音波処理を行うことで細胞質、細胞内小器官、細胞膜、核などを除去し、残留物を接着斑画分として回収した。これらの画分をプロテオーム解析に供した結果 vinexin α または CAP の発現により接着斑への濃縮が有意に変化していたタンパク質が 187 種類見つかった。その中には、細胞内張力を制御する KANK2、基質の硬さ感知に関わる Thy-1 が含まれており、これらの分子と vinexin α 及び CAP との関連をさらに検討することにした。その結果 vinexin α の発現に伴い、Thy-1 の細胞内のタンパク質レベルが上昇した。今後は vinexin α 及び CAP の発現の有無で、KANK2 の細胞内での発現量及び接着斑への濃縮度合いを調べる予定である。

Cells recognize the extracellular matrix(ECM), such as collagen, through protein complexes called focal adhesions. The stiffness has been shown to influence the migration rate and direction of differentiation. In addition, as the substrate stiffness changes, the proteins localized to the focal adhesions also change. In our laboratory, we previously showed that the focal adhesion proteins vinexin α and CAP are important for in sensing ECM stiffness. In this study, we try to identify molecules working with or downstream of vinexin α and CAP.

Using vinexin α and CAP knockout cells and the cells with restored expression of these proteins, we collected fractions of focal adhesion by the method of sonication. These fractions were subjected to proteomic analysis and 187 proteins were found to be significantly changed in focal adhesion due to the expression of vinexin α or CAP. Among them, we have focused on KANK2 and Thy-1 as candidate proteins and found that the intracellular protein level of Thy-1 increased with the expression of vinexin α.

Focal adhesion, Proteomic analysis, SORBS family protein

発表責任者：田辺　修平（tanabe.shuhei.33x@st.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3J07-04
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:30～ ミーティングルーム J

接着斑細胞膜と GPMV 法で単離した細胞膜の脂質組成の比較

Comparative analysis of the lipid composition of focal adhesion membrane and plasma membrane

○立花 大[1]、箕浦 広大[1]、長尾 耕治郎[2]、木村 泰久[1]、植田 和光[3]、木岡 紀幸[1]([1]京大院農、[2]京大院工、[3]京大 iCeMS)
○Hiroshi TACHIBANA[1], Kodai MINOURA[1], Kohjiro NAGAO[2], Yasuhisa KIMURA[1], Kazumitsu UEDA[3], Noriyuki KIOKA[1] ([1]Grad. Sch. of Agri., Kyoto Univ., [2]Grad. Sch. of Eng., Kyoto Univ., [3]iCeMS, Kyoto Univ.)

動物細胞と細胞外マトリックス(ECM)との接着部位に形成される接着斑は、ECMの硬さを初めとする細胞外環境を感知し、細胞内へとその情報を伝達する。最近になって、接着斑細胞膜が低流動性であることが示唆されたが、接着斑細胞膜の脂質組成やその生理的意義については不明な点が多い。私たちは接着斑細胞膜が特殊な脂質組成であり、それが細胞外環境を感知する接着斑の機能を調節されているという仮説を立てて、検証している。本研究では接着斑を単離し、そこに含まれている脂質をLC-MS/MSで網羅的に解析した。

細胞はマウス胎児繊維芽細胞を用い、フィブロネクチンでコートしたシャーレ上に播種した24時間後に19年度農芸化学会関西・中部支部大会で報告した接着斑単離手法にて接着斑画分を単離した。また、パラホルムアルデヒドあるいはN-エチルマレイミドの添加で細胞から放出させたGPMV(Giant Plasma Membrane Vesicle)を回収したものを細胞膜画分として比較した。それらの画分から脂質を抽出し、酵素蛍光法で脂質を定量するとともに、LC-MS/MSでコリンリン脂質のアシル鎖尾部について調べた。その結果、接着斑画分はコレステロールとスフィンゴミエリンのホスファチジルコリン(PC)に対する比率が高いことが示唆された。また、接着斑画分のPCは飽和な尾部あるいは不飽和の少ない尾部を持つものの割合が高く、逆に不飽和な尾部を持つPCが少ないことが明らかになった。これらの結果は、接着斑細胞膜が低流動性であるという先行研究を支持するものであり、接着斑細胞膜が特殊な脂質組成を持つことが明らかとなった。

Focal adhesion (FA), a complex formed at cell-extracellular matrix (ECM) adhesion site, is responsible for sensing ECM properties and transmitting the information inside the cell to regulate cell behavior. Previous studies suggest that FA membrane is low fluid, like lipid raft, but little is known about FA membrane composition. The purpose of our study is to analyze lipid composition of FA membrane comprehensively.

FA membrane fraction was isolated by hydrodynamic force method from mouse embryonic fibroblasts cultured on fibronectin-coated dishes. Lipids were analyzed by fluorescent enzyme assay and LC-MS/MS. The results showed that cholesterol/phosphatidylcholine (PC) and sphingomyelin/PC ratios in FA membrane fraction are higher than plasma membrane fraction, suggesting that FA membrane has specific lipid composition.

Focal adhesion, Plasma membrane, Lipid composition

講演番号：3J07-05
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:30～ ミーティングルーム J

マクロファージによる凝固・線溶系因子の発現と血小板凝集に及ぼすトリメチルアミン - *N*-オキシド（TMAO）の影響

The effect of TMAO on the expression of coagulation and fibrinolysis factors by macrophage and platelet aggregation.

○鈴木 健之[1]、AN Ni[1]、佐々木 翼[2]、松下 七海[2]、三浦 徳[3]、増澤（尾崎） 依[2]、細野 崇[1,2]、関 泰一郎[1,2,3]（[1]日大院・生資科・応生科、[2]日大・生資科・生命化、[3]日大・生資科・総合研究所）
○Takeyuki SUZUKI[1], Ni AN[1], Tsubasa SASAKI[2], Nanami MATSUSHITA[2], Atsushi MIURA[3], Yori OZAKI-MASUZAWA[2], Takashi HOSONO[1,2], Taiichiro SEKI[1,2,3] ([1]Nihon Univ. Grad. School, [2]Nihon Univ., [3]Nihon Univ. General Research Institute)

【目的】マクロファージ（Mφ）は酸化LDLを取り込んで泡沫化し、動脈硬化に関与している。近年、アテローム性動脈硬化症の促進因子としてトリメチルアミン-*N*-オキシド（TMAO）が報告された。乳製品や赤身肉などに豊富に含まれるコリンは、腸内細菌によりトリメチルアミン（TMA）へと代謝される。TMAは肝臓でフラビンモノオキシゲナーゼの作用によりTMAOとなり、Mφの泡沫化や血小板機能を亢進させて動脈硬化や易血栓性を誘導する可能性が指摘されている。本研究では、Mφの凝固・線溶系因子の発現、血小板凝集に及ぼすTMAOの影響について *in vitro* で解析し、動脈硬化におけるこれらの因子の機能について明らかにしようとした。【方法】マウス骨髄由来Mφ, マウス単球由来Mφ細胞株Raw264.7細胞にLPSやTMAOを添加培養し各種血液凝固・線溶系因子、サイトカインの発現をqPCRにより解析した。また、C57BL/6Jマウス、ヒト血液より多血小板血漿（PRP）、洗浄血小板を調製し、アグレゴメーターを用いてADPおよびトロンビンを凝集惹起物質としてTMAOが血小板凝集に及ぼす影響を検討した。【結果】MφにおけるTNFα, IL-1, tissue factor（TF）, tissue-type plasminogen activator（tPA）, urokinase-type PA（uPA）, uPARはLPS刺激により一過性に発現が誘導された。一方、LPSはPA inhibitor-1（PAI-1）発現を経時的に増加させたが、TF pathway inhibitor（TFPI）発現にはほとんど影響を及ぼさなかった。また、TMAOはこれらの因子の発現に対してはほとんど影響を及ぼさなかった。さらにADP, トロンビンにより惹起されるマウス、ヒト血小板凝集に対して、TMAOの影響は認められなかった。【結語】炎症状態のマクロファージは、TFやPAI-1の発現を介してプラークの形成や易血栓性に関与する可能性が明らかになった。また、TMAOは血小板機能やマクロファージの血液凝固・線溶系関連遺伝子の発現には影響を及ぼさないことが明らかとなった。

Macrophages (Mφ) plays important roles in the pathogenesis of atherosclerosis. Quite recently, it has reported that trimethylamine-*N*-oxide (TMAO) is an exacerbating factor for atherosclerosis. TMAO is a metabolite of choline which is abundant in dairy products and meat; TMAO is produced by both intestinal bacteria and flavin monooxygenase in the liver. This study was aimed to clarify the role of coagulation and fibrinolysis factors expressed by Mφ in the development of atherosclerosis as well as the effect of TMAO on the expression of these factors. It has been suggested that inflammatory macrophages are involved in the plaque formation and that the plaque triggering thrombosis through the upregulation of both TF and PAI-1 expression in atherosclerosis. It was also revealed that TMAO does not affect platelet function or these factors expressed by Mφ *in vitro*.

macrophage, atherosclerosis, inflammation

発表責任者：関泰一郎（seki.taiichiou@nihon-u.ac.jp）

講演番号：3J07-06
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:30～ ミーティングルーム J

低タンパク質食摂取時の血中可溶性レプチン受容体増加がレプチンの食欲抑制作用に与える影響

Effect of increased plasma soluble leptin receptor on appetite-suppressing effect of leptin in protein-restricted mice

○内山 瑞稀[1]、竹中 麻子[2] ([1]明治大院農、[2]明治大農)
○Mizuki UCHIYAMA[1], Asako TAKENAKA[2] ([1]Grad. Meiji Univ., [2]Meiji Univ.)

【背景】レプチンは,食欲抑制や代謝調節に働く脂肪細胞から分泌されるホルモンである。我々は,低タンパク質食を与えたラット及びマウスでは肝臓レプチン受容体（Ob-R）mRNA 量及び血中可溶性レプチン受容体（sOb-R）濃度が増加し，血中遊離レプチン指標が低下することを報告した。この結果は,タンパク質欠乏時にレプチン活性を調節する新たな機構の存在を示していた。そこで本研究では,低タンパク質食摂取マウスにレプチンを投与し,増加した血中 sOb-R がレプチン活性をどのように制御するのかを食欲抑制作用について解析した。【方法および結果】C57BL/6J 雄マウスを 4 群に分け,タンパク質を 20%含む対照食（20C）,あるいはタンパク質を 5%含む低タンパク質食（5C）をそれぞれ 2 群に与えて飼育した。実験食を与えた 8 日目から 4 日間,各食餌群の 1 群にレプチン（2 mg/kg）を 1 日 1 回腹腔内投与し,もう 1 群には vehicle として PBS を投与した。その結果,20C 摂取マウスにおいてはレプチン投与により摂食量が低下し,投与開始後 3 日目には有意な低下がみられた。一方で,5C 摂取マウスにおいてはレプチン投与による摂食量の有意な低下はみられなかった。この時,視床下部の NPY 遺伝子発現はレプチン投与により低下したが、これ以外の食欲調節因子遺伝子発現は,どちらの食餌群においてもレプチン投与による変化がみられなかった。【結論】以上の結果から,低タンパク質食の摂取によって増加した sOb-R は,外因性レプチンの食欲抑制作用を低下させる可能性が示された。

Leptin is a hormone secreted from adipose tissue and regulates fat stores by suppressing appetite and increasing energy expenditure. We have found that hepatic mRNA level of leptin receptor (Ob-R) and plasma soluble Ob-R (sOb-R) levels were increased in rats and mice fed low-protein diet. Plasma free leptin index was increased in these animals and indicated the existence of a novel mechanism by which protein nutrition regulates leptin activity. From these backgrounds, we aimed to investigate the effect of increased plasma sOb-R on appetite-suppressing activity of leptin by administrating leptin to mice fed low-protein diet. Food intake was reduced by leptin administration (2mg/kg, ip) in mice fed control diet but not in mice fed low-protein diet. These results demonstrated that increased plasma sOb-R due to protein deficiency may reduce the appetite-suppressing effect of exogenous leptin.

leptin, low-protein diet, plasma soluble leptin receptor

発表責任者：竹中麻子（takenaka@meiji.ac.jp）

講演番号：3J07-07
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:30～ ミーティングルーム J

タンパク質欠乏が血中グルカゴン濃度に及ぼす影響

Effect of protein deficiency on plasma glucagon concentration

○矢崎 純奈、荒木 雅弥、竹中 麻子 (明治大農)
○Junna YAZAKI, Masaya ARAKI, Asako TAKENAKA (Meiji Univ.)

【背景】我々は、タンパク質欠乏時にインスリン分泌が低下すること、同時にインスリン感受性が増加することで血糖値が低く維持されることをラットを用いて示してきた。インスリンに関する知見が集積する一方で、正確な定量が難しかったグルカゴンに関する情報は非常に限られている。近年、グルカゴンがアミノ酸代謝に重要なはたらきを持つとの認識が広がりつつあることから、本研究ではタンパク質欠乏に応答した血中グルカゴン濃度の変化を解析した。【方法】6 週齢の Wistar 系雄ラットにカゼインを 20%含む対照食(20C)、あるいは 5%含む低タンパク質食(5C)を 7 日間給餌した。12 時間絶食あるいは 12 時間絶食後 6 時間再給餌条件で解剖し、血漿および肝臓を採取した。血中グルカゴン濃度をサンドイッチ ELISA 法で測定した。また、肝臓の糖新生系酵素遺伝子発現をリアルタイム PCR 法で測定した。【結果】血中グルカゴン濃度は絶食時に高く、いずれの解剖条件でも 5C で 20C より低かった。糖新生系酵素の遺伝子発現も絶食時に高く、5C で 20C より低かった。【結論】血中グルカゴン濃度がタンパク質欠乏で低くなることを明らかにした。また、血中グルカゴン濃度と糖新生系酵素の遺伝子発現が同様に変化したことから、グルカゴンの低下が糖新生活性の低下を介してタンパク質欠乏時の血糖値低下に寄与する可能性が示された。

We have reported that insulin secretion was decreased during protein deficiency, and at the same time, insulin sensitivity was enhanced and results in low blood glucose level. Because there is very limited information about changes in glucagon in response to protein deficiency compared to insulin, this study aimed to investigate blood glucagon concentration in protein-restricted rats. Six-week-old male Wistar rats were fed a control diet (20C) containing 20% casein or a low-protein diet (5C) containing 5% casein for 7 days. Plasma and liver samples were collected after 12 hours of fasting or 6 hours of refeeding after fasting. Plasma glucagon concentration was measured by sandwich ELISA method, and hepatic mRNA levels of gluconeogenic enzymes were measured by realtime PCR. Plasma glucagon level and mRNA levels of gluconeogenic enzymes were high during fasting and were lower at 5C than at 20C under both anatomical conditions. The results of this study revealed that plasma glucagon concentration is lowered due to protein deficiency. In addition, decreased glucagon may contribute to a decrease in gluconeogenesis and blood glucose level during protein deficiency.

protein deficiency, glucagon, gluconeogenesis

発表責任者：竹中麻子（takenaka@meiji.ac.jp）

講演番号：3J07-08
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:30～ ミーティングルーム J

タンパク質欠乏時の肝臓脂肪と脂肪滴形成タンパク質量の経時変化
Time-dependent changes in the amount of liver lipid and lipid droplet-associated protein in rats fed a protein-deficient diet

○鶴田 泰崇[1]、荒木 雅弥[2]、小田巻 静香[2]、竹中 麻子[2] ([1]明治大院農、[2]明治大農)
○Yasutaka Tsuruta[1], Masaya Araki[2], Shizuka Odamaki[2], Asako Takenaka[2] ([1]Grad. Meiji Univ., [2]Meiji Univ.)

【目的】タンパク質欠乏のヒトやラットで脂肪肝が生じることが古くから知られており，肝細胞内の脂肪滴が増大することも確認されている。しかし，この時の脂肪滴形成過程についてはほとんど解析が行われていない。そこで本研究では，タンパク質欠乏時の脂肪滴形成タンパク質（adipose differentiation-related protein, ADRP） 量の変化を、肝臓脂質量と共に経時的に解析した。
【方法】5 週齢の Wistar 系雄ラットに、カゼインを 20%含む対照食（20C）あるいは 5%含む低タンパク質食（5C）を 1 日、7 日、16 日間給餌する 3 回の動物実験を行い、それぞれ経時的に解剖して肝臓サンプルを得た。(1) 1 日飼育： 8 ， 12 ， 16 ， 20, 24 時間解剖（各群 5 匹),(2) 7 日飼育： 1, 2, 3, 7 日解剖（各群 5 or 6 匹）,(3) 16 日飼育・解剖（各群 6 匹)。肝臓トリグリセリド（TG）量を市販試薬（酵素法），ADRP mRNA 量をリアルタイム PCR, ADRP 量をウェスタンブロットにより測定した。
【結果】肝臓 TG と ADRP 量の増加は、低タンパク質食給餌 12-16 時間後に生じ、その後一貫して高い状態を維持した。ADRP mRNA 量は給餌 1 日以内に一過的に増加したが、その後は増加せず、16 日後に再び増加した。
【結論】低タンパク質食給餌による肝臓脂肪蓄積は、給餌約 12 時間後に ADRP 量増加と一致したタイミングで生じることが示された。また、ADRP 量の増加は給餌 1 日以内には mRNA 量の増加を伴うが、その後は mRNA 量の増加を伴わず、翻訳以降の段階で制御される可能性が示された。

[Purpose] It has been shown that protein deficiency causes fatty liver and increases lipid droplets in hepatocytes. In this study, time-dependent change in the adipose differentiation-related protein (ADRP) during protein deficiency was investigated. [Methods] Five-week-old male Wistar rats were fed a control diet (20C) containing 20% casein or a low-protein diet (5C) containing 5% casein for the following period in three experiments; (1) 8, 12, 16, 20, 24 hours, (2) 1, 2, 3, 7 days, (3) 16 days. The amount of liver triglyceride (TG), ADRP mRNA and ADRP protein were measured. [Results and Conclusion] Hepatic lipid accumulation due to low-protein diet occurred at the same time with an increase in ADRP about 12 hours after feeding. The increase in ADRP protein level after 1 day of feeding the low-protein diet was not accompanied by an increase in mRNA level, indicating that it was increased by posttranslational regulation.

protein deficiency, liver lipid, ADRP

発表責任者：竹中麻子（takenaka@meiji.ac.jp）

講演番号：3J07-09
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:30～ ミーティングルーム J

肝臓 VLDL 受容体遺伝子発現の性差

Gender differences in hepatic VLDL receptor gene expression in rodents

○曹 玖祥[1]、加藤 拓[1]、佐藤 遼太[1]、横堀 友希[2]、竹中 麻子[2] ([1]明治大院農、[2]明治大農)
○Jiuxiang Cao[1], Taku Kato[1], Ryota Sato[1], Yuki Yokobori[2], Asako Takenaka[2] ([1]Grad. Meiji Univ., [2]Meiji Univ.)

【背景】VLDL 受容体（VLDLR）は VLDL を細胞内に取り込む受容体で、肝臓 VLDLR の増加が肝臓脂肪増加の原因となることが近年報告されている。われわれは、メスラットではオスより肝臓トリグリセリド（TG）濃度が高いこと、肝臓 TG 濃度がテストステロンにより抑制されることを報告してきた。本研究では、肝臓 VLDLR 発現の性差を解析し、肝臓脂肪量の性差との関連性を検討した。
【方法・結果】 1）雌雄の C57BL/6J マウスの肝臓 VLDLR mRNA 量を測定したところ、オスよりメスの方が VLDLR 発現が高かった。肝臓トリグリセリド（TG）濃度には、雌雄の間に有意な差はみとめられなかった。2）6 週齢の Wistar 系雄ラットの精巣を除去し、30 日後の肝臓を採取した。肝臓 VLDLR mRNA 量と TG 濃度は共に精巣除去群で偽手術群より高かった。 3）5 週齢の Wistar 系雌ラットの卵巣を除去し、23 日後の肝臓を採取した。肝臓 VLDLR mRNA 量と TG 濃度は共に卵巣除去群で偽手術群より高かった。
【結論】肝臓 VLDLR 発現はオスよりメスの方が高いことが明らかになった。さらに、精巣由来のホルモン（テストステロン）と卵巣由来のホルモン（エストロゲン）がいずれも VLDLR 発現と肝臓 TG 量を抑制する可能性が示された。VLDLR 発現が雌雄の性ホルモンにより制御され、この作用の違いによって VLDLR 発現の性差が生じる可能性が考えられた。

[Background] It has been reported that an increase in hepatic VLDL receptor (VLDLR) was a cause of an increase in liver lipid. We have reported that female rats had higher liver triglyceride (TG) level than male rats, and that liver TG level was suppressed by testosterone. In this study, we analyzed the gender difference of liver VLDLR expression and investigated the relationship with the gender difference of liver lipid levels.
[Methods and Results] VLDLR expression was higher in female mice than in male mice. VLDLR expression and TG levels in the liver both increased after orchidectomy and ovariectomy in rats.
[Conclusion] Liver VLDLR expression is higher in females than in males. Hormones secreted from testis and ovary both suppress VLDLR expression and hepatic TG concentration. Gender difference of VLDLR expression may arise from the different action of sex hormones.

VLDLR, gender differences, liver triglyceride

発表責任者：竹中麻子（takenaka@meiji.ac.jp）

講演番号：3J07-10
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:30～ ミーティングルーム J

腸内細菌叢と宿主の共役的なポリアミン代謝は 大腸の上皮増殖とマクロファージ分化を調節する
Symbiotic polyamine metabolism regulates epithelial proliferation and macrophage differentiation in the colon

○中村 篤央[1,2]、栗原 新[3]、松本 光晴[2]、長谷 耕二[1]([1]慶應大薬、[2]協同乳業、[3]近畿大生物理工)
○Atsuo Nakamura[1,2], Shin Kurihara[3], Mitsuharu Matsumoto[2], Hase Koji[1] ([1]Keio Univ., [2]Kyodo Milk Industry Co. Ltd., [3]Kindai Univ.)

ポリアミン（プトレッシン:PUT、スペルミジン:SPD、スペルミン）は、多様な生理機能を有し、細胞の健全性の維持に必須である。SPD は、真核生物の翻訳開始・伸長因子 eIF5A のハイプシン化と呼ばれる翻訳後修飾の基質としての役割も有する。腸内細菌叢由来ポリアミンは主要な外因性ポリアミンと考えられるが、宿主への取込みとその作用を直接的に証明した報告は無い。本研究では、PUT 合成酵素遺伝子を破壊した *E. coli*（SK930）および野生株（WT）をそれぞれ単独定着させて大腸管腔内の PUT 濃度に差のあるノトバイオートマウスを作製し、腸内細菌叢由来 PUT の腸管上皮細胞およびマクロファージ(Mφ)に対する影響とその作用機序を検証した。

WT 群は SK930 群と比較し、大腸上皮細胞中のポリアミン濃度が有意に高く、大腸上皮細胞においては有意な増殖亢進が認められた。WT 群は SK930 群と比較し、大腸粘膜固有層中の抗炎症性 Mφの比率が高く、炎症性 Mφの比率が低かった。上皮バリア機能と Mφが病態形成に関与する DSS 腸炎モデルでは、WT 群は SK930 群より高い抵抗性を示した。安定同位体を用いて大腸オルガノイドと骨髄由来 Mφの PUT の取込みを検証した結果、両者で環境中 PUT の細胞内への取込みと SPD への変換が確認された。ポリアミン合成阻害剤およびハイプシン化阻害剤を用いた実験により、これらの作用は PUT から変換された SPD を介した eIF5A のハイプシン化が関与していることが確認された。本研究は、腸内細菌叢が産生した PUT（前駆体）が宿主細胞に吸収され、宿主の代謝系で生理活性物質 SPD へと変換されることで大腸上皮と腸管免疫系の健全性に寄与することを証明した。これは、腸内細菌叢の代謝系と宿主代謝系との連動(symbiotic metabolism)による生理活性物質産生という新たな概念といえる。

Polyamines, such as putrescine and spermidine, are produced by the gut microbiota and regulate multiple biological processes. However, no direct evidence has shown that microbial polyamines are incorporated into host cells to regulate cellular responses. Colonization by wild-type, but not polyamine biosynthesis-deficient, *Escherichia coli* in germ-free mice raised intracellular polyamine levels in colonocytes, accelerating epithelial proliferation. Commensal bacterium-derived putrescine increased the abundance of anti-inflammatory macrophages in the colon. The bacterial polyamines ameliorated symptoms of DSS-induced colitis in mice. These effects mainly resulted from enhanced hypusination of eukaryotic translation initiation factor 5A.

This is the first study to directly observe that polyamines derived from gut microbiota regulate the host's physiological function by symbiotic metabolism between the commensals and the host.

gut microbiota, intestinal epithelial cell, macrophage

発表責任者：中村　篤央（a-nakamura@meito.co.jp）

講演番号：3J07-11
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:30～ ミーティングルーム J

創薬に有用な熱安定型セルピンの創出と開発戦略

Creation of a thermostable active serpin useful for drug design and its development strategy.

○山本 拓実、綿谷 凌、恩田 真紀（大阪府立大・理・生物）
○Takumi YAMAMOTO, Ryo WATATANI, Maki ONDA (Dept. of Biol. Sci., Grad. Sch. of Sci., Osaka Pref. Univ.)

【背景と目的】セルピン(serine protease inhibitor スーパーファミリーに属する蛋白質群)は、認知症、肺気腫、血栓症、COVID-19 重症化など、様々な疾患に関与し、薬剤によるセルピンの機能制御は重要な課題の 1 つである。しかし、セルピン族には特有の、自発的な不活性型への構造転移(Latent 化やポリマー化)があり、これが分子構造を基盤とした薬剤開発の妨げとなっている。本研究は、立体構造および生理機能は野生型と同等で、且つ活性型構造を安定に保持できるセルピン変異体の創出と、その戦略について報告する。

【方法と結果】アルツハイマー病治療薬開発の標的分子であるニューロセルピン(NS)をモデル蛋白質とした。アミノ酸配列アライメントから、NS の不安定化要因が N161-L162-V163 にあると推定し、変異体 NS_{GKI} (N161G/L162K/V163I)を作製した。NS_{GKI} は野生型より熱安定(ΔT_m= 7.8ºC)で、latent 化やポリマー化に対する耐性を獲得しており、且つ、活性(tPA 阻害)は野生型と同等であった。更に、X 線結晶構造解析を行い(2.39Å 分解能)、立体構造が野生型と極めてよく一致している(RMSD: 0.40Å)ことを証明した。NS_{GKI} の安定化機構を、結晶構造データ、及び新たに調製した数種類の NS 変異体を使って解析し、得られた知見を基に、同様の戦略で、α_1-アンチトリプシン(COVID-19 重症化に関与)についても安定型変異体を作製した。

Proteins belong to the serpin superfamily are involved in a wide range of diseases including dementia (neuroserpin), thrombosis (PAI-1) and emphysema/cirrhosis/aggravation of COVID-19 (α_1-antitrypsin), hence the development of drugs for control of serpin activities are highly demanded. We successfully created a novel thermostable mutant of neuroserpin (NS_{GKI}: N161G/L162K/V163I) useful for drug design based on a sequence alignment of the serpin superfamily. This mutant had a 7.8ºC higher T_m as compared with the wildtype and resistance to transition into inactivated forms (the latent protein and polymers) while retaining a wildtype-equivalent inhibitory activity. We determined the crystal structure of NS_{GKI} at 2.39Å, which revealed that the structure is exactly consistent with that of the wildtype (RMSD: 0.40Å). Our mutation experiments figured out the stabilization mechanism of NS_{GKI}, and based on this, a novel thermostable mutant of α_1-antitrypsin was prepared.

SBDD, inhibitors, Alzheimer's disease

講演番号：3J07-12
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:30～ ミーティングルーム J

セルピン病治療薬開発に有用な標的分子模倣体の創出

Creation of a mimic of a target molecule for the development of drugs to treat serpinopathies.

○品田 紗智子、恩田 真紀（大阪府立大・理・生物）
○Sachiko SHINADA, Maki ONDA (Dept. of Biol. Sci., Grad. Sch. of Sci., Osaka Pref. Univ.)

【背景と目的】セルピン蛋白質の変異体がポリマー化して発症する家族性疾患をセルピン病と呼び、認知症(ニューロセルピンの H338R 変異体：以下 H338R)や肺気腫(α_1-アンチトリプシン)がよく知られている。α_1-アンチトリプシン変異体関連疾患は東洋では極めて稀であるが、南欧では 28%、北米では 10%が病原性変異体保有者で、COVID-19 重症化の一因となっている。 セルピンのポリマーは、folding 中間体 M*(C 末から約 100 残基の領域が部分的に unfolding している)が分子間でドメインスワップすることにより伸長する。 即ち、ポリマーの直接の前駆体は Native 型ではなく M*で、これが治療薬の標的分子の一つとされている。 本研究では、H338R を利用した創薬に有用な安定な M*模倣体の調製法と、その分子構造の特徴について報告する。

【方法と結果】大腸菌封入体から調製した尿素変性 H338R を中性緩衝液で希釈して refolding させると、Native 型にまで戻れず中間体で folding が停止した。 得られた分子種は凝集しやすく創薬標的に不向きであったため、安定化のために S-S 結合を導入した変異体 H338R/T296C/E343C（以下 $H338R_{S\text{-}S}$）から folding 中間体を調製し、その諸性質を円偏光二色性や蛍光分析、電気泳動法で調べた。その結果、得られた分子種の構造は MD で予測されている M*のそれとよく一致しており、且つ単量体で長時間安定に存在できる、本研究の目的に適う模倣体であることが分かった。 現在、α_1-アンチトリプシンについても、同様の手法で M*模倣体を作製している。

Serpinopathies result from polymerization of pathogenic mutants of serpins such as the H338R variant of neuroserpin (dementia) and the S/Z variants of α_1-antitrypsin (emphysema and aggravation of COVID-19). Serpin polymers are formed from a late folding intermediate M* *via* domain swapping, and thus M* is a target molecule for the development of drugs to treat the diseases. We successfully prepared a stable folding intermediate mimic of M* useful for drug design from the H338R/T296C/E343C mutant of neuroserpin ($H338R_{S\text{-}S}$). The mimic had a fold that is consistent with M* structure predicted by MD simulations, in addition stayed in a monomer for several days. Based on this strategy, preparation of a mimic of M* of α_1-antitrypsin is ongoing.

drug design, dementia, protein aggregation

講演番号：3J07-13
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:30～ ミーティングルーム J

セルピンポリマーの凝集体形成機構
The aggregation mechanisms of serpin polymers.
米倉 百音、○恩田 真紀（大阪府立大・理・生物）
Mone YONEKURA, ○Maki ONDA (Dept. of Biol. Sci., Grad. Sch. of Sci., Osaka Pref. Univ.)

【背景と目的】セルピン族の蛋白質はポリマー化しやすく、これが生体内に蓄積すると、認知症（ニューロセルピン）や肝硬変／肺気腫（α_1-アンチトリプシン）が発症する。 セルピンのポリマー化機構については、X 線結晶構造解析に基づいた詳細な研究がなされているが、ポリマーどうしが lateral な相互作用により分解困難な凝集体を形成する過程はほとんど解析がなされていない。 本研究では、セルピンの中で唯一アミロイド線維を形成することが確認されているオボアルブミン(OVA)と、病原性セルピン（ニューロセルピン，α_1-アンチトリプシン）をモデルとして、ポリマーからの凝集体形成について調べた。

【方法と結果】OVA のアミロイド線維形成過程は、チオフラビン T（ThT）をプローブとした DSF（differential scanning fluorometry）により追跡できる（*Biochemistry* 2018）。 病原性セルピンについても同手法で解析したところ、OVA と同様の ThT 蛍光の増大が見られた。 セルピンの C 末端 30-40 残基は凝集傾向が高いアミノ酸配列になっており、且つセルピン間で高度に保存されている。 この領域を除いたセルピン（H 鎖）を DSF および Native-PAGE で解析したところ、直鎖ポリマーの形成は可能なものの、凝集体の形成が起こらなかった。しかし、この H 鎖ポリマーに C 末端断片（L 鎖）を添加すると、ThT と強く結合する凝集体を形成することが明らかとなった。 L 鎖は H 鎖の特定の部位に特異的に結合しており、FRET(fluorescence resonance energy transfer)測定より、その部位を特定した。

Serpinopathies are caused by accumulation of serpin polymers within body tissue, e. g., hepatocytes (α_1-antitrypsin) and cerebral cortex (neuroserpin). The polymerization mechanisms of serpins are well-researched based on crystallography, whereas the clumping mechanisms of serpin polymers into toxic aggregates have not been clarified. We present here the aggregation pathways and mechanisms of polymers of an amyloidogenic serpin (ovalbumin) and pathogenic serpins (α_1-antitrypsin and neuroserpin) by DSF, FRET and Native-PAGE analyses with our unique refolding system focused on the C-terminal region of serpins, which is the final folding region during folding and the linkage of serpin polymers.

protein aggregation, ovalbumin, amyloid fibrils

発表責任者：恩田真紀（onda@b.s.osakafu-u.ac.jp）

講演番号：3J07-14
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:30～ ミーティングルーム J

「低密度リポタンパク質における酸化リン脂質修飾構造の解析」
Covalent modification of low-density lipoprotein by oxidized phospholipids
○大塚 優人[1]、青山 拓生[1]、平出 直哉[1]、内田 浩二[2]、柴田 貴広[1]([1]名大院生命農、[2]東大院農生科)
○Yuto OTSUKA[1], Takuo AOYAMA[1], Naoya HIRADE[1], Koji UCHIDA[2], Takahiro SHIBATA[1]
([1]Grad. Sch. of Bioagric. Sci. Nagoya Univ, [2]Grad. Sch. of Agric. and Life Sci., The Univ. of Tokyo)

【目的】低密度リポタンパク質（LDL）はコレステロールの輸送を担う分子であり、中心部にコレステロールエステルを内包するリン脂質の単層膜と、それに複雑に絡み合った 1 分子の apoB-100 タンパク質から構成されている。LDL の酸化的修飾は、特に動脈硬化症との関連が示唆されている。酸化された脂質による共有結合修飾を受けた LDL が、マクロファージによる過剰な貪食を受けて発症するとされているが、LDL の酸化的修飾構造の全容は未だ十分に理解されていない。そこで本研究では、LDL における酸化的修飾構造の同定と、その簡便な検出法の確立を目的とした。
【方法・結果】ヒト血清から単離した LDL を Cu^{2+}により酸化し、酸化 LDL を調製した。LDL 中に豊富に含まれるホスファチジルコリン(PC)に注目し、PC が共通して持つホスホコリン部分のフラグメントイオンを利用した LC-MS/MS による PC 修飾構造の網羅解析を行った結果、SONPC（1-stearoyl-2-(9-oxononanoyl)-*sn*-glycero-3-phosphocholine）及び PONPC（1-palmitoyl-2-(9-oxononanoyl)-*sn*-glycero-3-phosphocholine）がリジン残基とシッフ塩基型あるいはアミド型の結合をした修飾構造を同定した。また、同定した修飾構造の簡便な検出法を確立するために、PONPC 修飾タンパク質を免疫することにより、モノクローナル抗体を樹立した。
【総括】酸化された LDL 中では、リジン残基において SONPC 及び PONPC のシッフ塩基付加体やアミド型付加体が形成することを見出した。これらの修飾付加体を簡便に検出することが可能になれば、動脈硬化のマーカーとしての応用が期待される。

The oxidative modification of low-density lipoprotein (LDL) is thought to be involved in the pathogenesis of atherosclerosis. However, the structural properties of adducts in oxidized LDL are not fully elucidated. In the present study, we attempted to characterize the oxidized LDL using a mass spectrometry-based comprehensive analysis designed to detect the specific product ions from positively ionized oxidized phosphatidylcholine (oxPC) adducts. As a result, two oxPC-lysine Schiff base adducts and two oxPC-lysine amide adducts were identified as the major oxPC adducts in oxidized LDL.

oxidative stress, phospholipids, post-translational modification

発表責任者：大塚優人（otsuka.yuto@k.mbox.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：3J07-15
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:30～ ミーティングルーム J

脂質輸送体 ABCA1 の HDL 産生活性およびコレステロールフロップ活性の調節

C-terminus of ABCA1 separately regulates cholesterol-flopping activity and HDL-generating activity

○小笠原 史彦[1]、岡本 雄介[2]、木村 泰久[2]、木岡 紀幸[1,2]、植田 和光[1] ([1]京大 iCeMS、[2]京大院農)
○ Fumihiko OGASAWARA[1], Yusuke OKAMOTO[2], Yasuhisa KIMURA[2], Noriyuki KIOKA[1,2], Kazumitsu UEDA[1] ([1]iCeMS, Kyoto Univ., [2]Agric., Kyoto Univ.)

ATP-binding cassette A1 (ABCA1)は善玉コレステロール(HDL)の産生に必須な脂質輸送体である。HDL 産生を介した ABCA1 によるコレステロールの排出は、末梢におけるコレステロールの過剰な蓄積を防ぐ役割を果たしている。近年、ABCA1 が HDL を産生するだけでなく、細胞膜において脂質二重膜内層から外層へコレステロールをフロップする活性をもつことを我々は報告した。この活性によって作られる細胞膜コレステロール非対称性は一部のシグナル伝達において重要であることが示唆されている。しかし、ABCA1 がもつこれら二つの活性がどのように調節されているかはまだ全くわかっていない。

本研究では、ABCA1 の特徴的な C 末端領域に着目し、その調節機構を解析した。その結果、C 末端領域には ABCA1 の機能に重要な二つのモチーフが存在することがわかった。さらに、そのうち一つのモチーフに変異を入れたところ、HDL 産生活性は保持していたが、コレステロールフロップ活性を損なっていた。これらの結果から、ABCA1 の HDL 産生活性とコレステロールフロップ活性は別々に調節されており、C 末端領域がその調節に重要であることが示唆された。

ATP-binding cassette A1 (ABCA1) is a lipid transporter, which is essential for generating HDL, the so-called good cholesterol. Cholesterol export from peripheral tissues via HDL is the only way to eliminate excess cholesterol from the tissues. Recently, we reported that ABCA1 has another activity to transport cholesterol from the inner to the outer leaflet of the plasma membrane, that is, flop cholesterol in the plasma membrane. Cholesterol asymmetry formed by ABCA1 is suggested to play a role in regulating some signal transduction. It is, however, unclear how ABCA1 switch the two activities.

In this study, we focused on a unique C-terminal region of ABCA1 and explored motifs important for regulating the two activities. Consequently, it was found that there are two motifs necessary for the activities. When one of them was mutated, the HDL-generating activity was retained, but the cholesterol-flopping activity was impaired. These results suggest that the HDL-generating activity and cholesterol-flopping activity of ABCA1 are regulated separately, and that the C-terminal region switches the two activities.

ABCA1, cholesterol, HDL

講演番号：3J07-16
質疑応答日時、会場：3 月 20 日 13:30～ ミーティングルーム J

アスコルビン酸の関与するピロール化タンパク質の形成

The formation of pyrrolated protein contributed by ascorbic acid

○吉武 淳[1]、柴田 貴広[2]、内田 浩二[3] ([1]名大 未来社会、[2]名大院・生命農学、[3]東大院・農学生命)
○Jun YOSHITAKE[1], Takahiro SHIBATA[2], Koji UCHIDA[3] ([1]Institute of Innovation for Future Society, Nagoya Univ., [2]Grad. Sch. of Bioagric. Sci., Nagoya Univ., [3]Grad. Sch. of Agric. and Life Sci., The Univ. of Tokyo)

細胞膜の主要な構成成分である脂質は、脂質過酸化反応と呼ばれる複雑な反応により親電子性の高いアルデヒド類を形成する。これらアルデヒド類はリジンやヒスチジンなどの求核性アミノ酸残基に、非酵素的に付加体を形成する。タンパク質ピロール化は、リジン残基にピロール環を形成する非酵素的な翻訳後修飾であり、DNA インターカーレーターとの結合能の獲得やタンパク質表面の正電荷の相対的な減少など、タンパク質に DNA 様の性質を付与する翻訳後修飾である。ピロール化タンパク質は自己免疫疾患モデルマウスの血清に対して抗原性を示すことから、自己免疫疾患への関与が示唆されるなど、ピロール化タンパク質の生理作用は解明されつつあるが、生体内形成メカニズムは不明であった。近年、銅イオン/過酸化水素系による脂質過酸化物の解析から、グリコールアルデヒド（GA）が脂質過酸化依存的なピロール化の形成に関与していることが示唆された。より生理的な条件である鉄・アスコルビン酸系による脂質過酸化物を用いてピロール化リジン形成を試みたところ、驚いたことに脂肪酸非存在化でもピロール化リジンの形成が観察された。そこで本研究ではアスコルビン酸（AsA）によるピロール化リジン形成メカニズムの解明を目的とした。鉄イオン存在化で AsA とリジンを反応したところ、AsA 濃度に依存的なピロール化リジンの形成が観察された。また AsA と鉄イオンの反応液から GA が検出されたこと、さらに AsA によるピロール化リジン形成は、鉄イオンの添加によって増加し金属キレート剤の添加によって抑制されることから、AsA と鉄の反応によって GA が形成され、ピロール化を惹起する可能性が示唆された。またタンパク質や細胞を鉄イオン存在下で AsA 処理することでピロール化リジンが形成されることから、AsA の関与するピロール化は生体内においても普遍的に惹起されている可能性が示唆された。

The posttranslational modifications of proteins are thought to be involved in various pathological and physiological phenomena. Protein *N*-pyrrolation is a non-enzymatic modification that forms the pyrrole framework in the lysine residue. It has been suggested that *N*-pyrrolated proteins contribute to the autoimmune disease, since the protein *N*-pyrrolation confers DNA mimic characteristic on the protein, such as the interaction with DNA intercalators. However, the endogenous source of *N*-pyrrolation was remained unclear. Recently, glycolaldehyde was identified as one of the endogenous sources of *N*-pyrrolated lysine as a result of the reaction of lysine with lipid peroxidation products. Here we report that *N*-pyrrolated lysine is found to form in the reaction of lysine with ascorbic acid in the presence of ferrous.

Protein *N*-Pyrrolation, Ascorbic acid, posttranslational modification

発表責任者：吉武淳（yoshijun@agr.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：4A01-01
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:00～ ミーティングルーム A

黄色ブドウ球菌由来メンブレンベシクル中に内包される病原因子の特性解析

Virulence factors contained in *Staphylococcus aureus*-derived membrane vesicles

○山梨 佑花[1]、島村 裕子[1]、小室 岬[2]、佐々木 邦明[2]、増田 修一[1]([1]静岡県大院・薬食生命、[2]岩手大・電子顕微鏡室)
○Yuka YAMANASHI[1], Yuko SHIMAMURA[1], Misaki KOMURO[2], Kuniaki SASAKI[2], Shuichi MASUDA[1] ([1]Univ. of Shizuoka, [2]Iwate Univ.)

【目的】多くの細菌は、菌体由来分子を包み込んだ膜小胞 (メンブレンベシクル; MVs) を放出する。本研究では、黄色ブドウ球菌由来 MVs 中に内包される病原因子の特性を明らかにすることを目的に、MVs を介した毒素 (SEA) 遺伝子の伝播の有無について検討するとともに、異なる培養時間における MVs 中の内包タンパク質の差異とその性状について解析した。
【方法】SEA 産生株である No.29 株由来の MVs 中の SEA ファージの有無について Western blot および PCR を用いて調べた。また、MVs を SEA 非産生株である No.77 株に添加し、SEA 遺伝子伝播の有無を確認した。さらに、異なる培養時間における No.29 株由来 MVs の粒子径および内包タンパク質の差異について解析した。各培養時間で得られた No.29 株由来 MVs を RBL-2H3 細胞で刺激し、I 型アレルギー反応である脱顆粒の誘導およびアレルギー関連遺伝子の発現を調べた。
【結果・考察】No.29 株由来 MVs 中には、SEA をコードするファージが内包されており、No.77 株に No.29 株由来 MVs を添加して培養したところ、No.77 株から SEA 遺伝子が検出されたことから、MVs を介して細菌間で SEA 遺伝子が伝播することが示唆された。異なる培養時間における No.29 株由来 MVs の粒子径に差異は認められなかったが、MVs 中の内包タンパク質および RBL-2H3 細胞に対する脱顆粒の誘導およびアレルギー関連遺伝子の発現パターンに差が認められた。これらの結果より、黄色ブドウ球菌により放出される MVs は、培養時間ごとに特異的性質の違いがあることが示唆された。

Most bacteria release membrane vesicles (MVs) that contain specific bacterial components. In this study, the transfer of staphylococcal enterotoxin A (SEA) gene via *S. aureus*-derived MVs was examined. In addition, differences in inclusion proteins in MVs and their properties at different culture times were evaluated.

The phages encoding SEA were included in the MVs derived from the SEA-producing strain *S. aureus* No.29. When MVs derived from *S. aureus* No.29 were added to *S. aureus* No.77 (SEA non-producing strain), the SEA gene of *S. aureus* No.29 was transferred to *S. aureus* No.77 strain. There was no difference in the particle size of MVs derived from *S. aureus* No.29 at different culture times. Due to the difference in protein in MVs, expression pattern of allergy-related genes in RBL-2H3 cells was observed for each culture time. These results suggest that the MVs derived from *S. aureus* have different specific properties depending on the culture time.

Staphylococcus aureus, membrane vesicles, staphylococcal enterotoxin A

発表責任者：増田 修一（masudas@u-shizuoka-ken.ac.jp）

講演番号：4A01-02
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:00～ ミーティングルーム A

Increase of extracellular membrane vesicle production by deletion of genes involved in outer membrane-peptidoglycan linkage of *Shewanella vesiculosa* HM13

○Mengshan Zhu[1], Takuya Ogawa[1], Jun Kawamoto[1], Tomoya Imai[2], Tatsuo Kurihara[1] ([1]Institute for Chemical Research, Kyoto University, [2]Research Institute for Sustainable Humanosphere, Kyoto University)

Extracellular membrane vesicles (EMVs) are nanosized particles secreted by bacteria and have potential application as a platform for extracellular production of recombinant proteins. *Shewanella vesiculosa* HM13, a psychrotrophic Gram-negative bacterium isolated from the intestinal contents of horse mackerel, abundantly produces EMVs carrying a putative S-layer protein P49 as a single major cargo protein. This bacterium is potentially useful as a host for the production of thermolabile proteins and proteins showing toxic enzymatic activities. In Gram-negative bacteria, the outer membrane is connected to the peptidoglycan (PG) predominantly through Braun's lipoprotein (Lpp), and formation of this linkage is catalyzed by L,D-transpeptidase. Studies have shown that EMV production is facilitated by decreasing this linkage. In this study, we examined whether this method is applicable to *S. vesiculosa* HM13 to increase its utility by removing Lpp and L,D-transpeptidase. We also examined the function of a putative glycosyl hydrolase that may catalyze the hydrolysis of PG and thereby weaken the linkage between PG and the outer membrane to increase the productivity of EMVs. We deleted the genes encoding Lpp (*hm3517*), L,D-transpeptidase (*hm3758*), and the putative glycosyl hydrolase (*hm1529*) and evaluated the EMV productivity of the mutants. The concentration and size of EMVs were measured by lipid staining and nanoparticle tracking analysis, and their morphology was observed by transmission electron microscopy. As a result, deletion of *hm1529* caused no significant difference in EMV production. In contrast, about 2 to 3.5-fold increase in EMV production was achieved by deletion of *hm3517* and *hm3758*. The morphology of EMVs of these mutants was similar to that of the parent strain. In accordance with the increase in EMV production, the amount of P49 in EMVs was also increased. These findings will contribute to the development of the EMV-based protein production system by using *S. vesiculosa* HM13 as the host.

extracellular membrane vesicle, lipoprotein, protein secretion

発表責任者：Mengshan Zhu（mengshanzhu@mbc.kuicr.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：4A01-03
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:00～ ミーティングルーム A

Shewanella vesiculosa HM13 の菌体外膜小胞への積荷タンパク質輸送機構における表層多糖の生理的役割

Physiological role of surface saccharides of extracellular membrane vesicles in the cargo transportation mechanism of *Shewanella vesiculosa* HM13

○釜阪 紘平、川本 純、小川 拓哉、栗原 達夫（京都大学化学研究所）
○Kouhei KAMASAKA, Jun KAWAMOTO, Takuya OGAWA, Tatsuo KURIHARA (Institute for Chemical Research, Kyoto Univ)

Shewanella vesiculosa HM13 は、S 層タンパク質と推定される P49 を主要な積荷とする菌体外膜小胞 (EMV) を高生産する。これまでに、精製 P49 が *in vitro* で EMV との結合能を有することをあきらかにした。P49 遺伝子を含む遺伝子クラスター内には、細胞表層糖鎖の前駆体を細胞質からペリプラズムへと輸送するフリッパーゼ Wzx のホモログをコードする遺伝子 (*wzx2*) が存在する。*wzx2* 遺伝子破壊株 (ΔWzx2) が生産する EMV では、P49 との *in vitro* 結合能が著しく低下していた。*wzx2* 相補用プラスミドの導入により、P49 と EMV の結合能が回復したことから、Wzx2 が EMV と P49 の結合能に重要であることが示された。本研究では、Wzx2 の欠損が EMV の表層糖鎖構造におよぼす影響をあきらかにすることを目的とし、ΔWzx2 および親株の EMV を多糖抽出に供し、SDS-PAGE とアルシアンブルー染色により解析した。その結果、親株の EMV から約 100 kDa の位置に主要なバンドが検出されたのに対し、ΔWzx2 由来の EMV では、主要なバンドが消失していた。*wzx2* の相補株由来の EMV では主要なバンドが検出されたことから、Wzx2 は約 100 kDa の位置に検出される多糖の合成に関与することが示唆された。以上より、P49 は、Wzx2 依存的に合成される多糖との相互作用により EMV へと輸送されると考えられた。

Shewanella vesiculosa HM13 produces an abundant amount of extracellular membrane vesicles (EMVs) carrying a putative S-layer protein, P49, in high purity. Our previous results showed that isolated EMVs bound to purified P49 *in vitro*. The disruption of *wzx2*, which is included in the gene cluster containing the P49 gene and codes for a Wzx homolog (Wzx2), impaired binding of EMVs to P49. Plasmid-based expression of *wzx2* restored the binding capacity of EMVs, indicating that Wzx2 plays a key role in the interaction between P49 and EMVs. Wzx is a flippase that translocates lipid-linked oligosaccharides from the cytoplasm to the periplasm in the course of biosynthesis of cell surface polysaccharides. Here, to elucidate the function of Wzx2 in the production of polysaccharides of EMVs, we extracted polysaccharides from EMVs and analyzed the extracts by SDS-PAGE and Alcian blue staining. A major band was detected around 100 kDa from the EMVs of the parent strain, whereas the disruption of *wzx2* caused the disappearance of the major band. Introduction of *wzx2*-expression plasmid to ΔWzx2 suppressed the disappearance of the major band, suggesting that Wzx2 is involved in the synthesis of polysaccharides required for the loading of P49 onto EMVs of *S. vesiculosa* HM13.

Shewanella, extracellular membrane vesicle, polysaccharide

発表責任者：釜阪　紘平（kmsk.k121@mbc.kuicr.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：4A01-04
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:00～ ミーティングルーム A

糸状菌の菌糸生長における細胞柔軟性と生長速度のトレードオフ

Trade-off between plasticity and velocity in mycelial growth

○山本 里穂[1]、福田 紗弓[1]、柳沢 直樹[2]、高谷 直樹[1]、佐藤 良勝[2]、竹下 典男[1] ([1]筑波大・生命環境 / MiCS、[2]名古屋大・ITbM)
○Riho Yamamoto[1], Sayumi Fukuda[1], Naoki Yanagisawa[2], Naoki Takaya[1], Yoshikatsu Sato[2], norio Takesita[1] ([1]University of Tsukuba ・ MiCS, [2]ITbM)

糸状菌は菌糸先端に細胞極性を維持し、その先端を伸長させて生長する。菌糸の先端生長は必要なタンパク質や脂質が分泌小胞の輸送とエキソサイトーシスによって細胞先端の細胞膜へ供給されることで起こる。さらに細胞膜が細胞壁を外側に向かって押す膨圧も細胞伸長に関与する。糸状菌は何らかの基質や動植物の細胞間のような微小空間に菌糸を侵入させて伸長する。この際、菌糸細胞が形を変えて生長する性質(柔軟性)が重要であると考えられる。このように、微小空間に侵入する菌糸の伸長には細胞極性と細胞の柔軟性が大きく関与しているが、両者の関係性は不明である。そこで、本研究では菌糸直径より狭い 1 μm 幅の流路をもつマイクロ流体デバイスを作製し、そのデバイス内で様々な糸状菌を培養し菌糸生長を顕微鏡で経時的に観察することで、細胞極性と柔軟性の関係を解析した。その結果、調べた 7 種全ての菌糸が 1 μm 幅の流路に侵入したが、*Neurospora crassa* などの種では、その流路途中で伸長を停止する菌糸や、流路から出た直後に細胞極性を失い、異常な形態を示す菌糸が見られた。このような伸長停止や脱極性という現象は系統分類や菌糸直径と相関がなく、菌糸の伸長速度と相関が見られた。本研究は菌糸の伸長速度と細胞柔軟性のトレードオフを明らかにした。

Filamentous fungi grow by polarized tip extension and lateral branching. It is well known that tip-growing fungal cells maintain the cell polarity at the apical regions and elongate by de novo synthesis of cell wall. Tip elongation is regulated by the supply of vesicular carriers containing the necessary proteins and lipids. In addition, turgor pressure is one of the major forces regulating the expansion speed at the hyphal tip. Cell polarity and growth rate affect the hyphal morphogenesis. However, how cell polarity and growth act cooperatively to control cell shape remains unclear. Here we investigated their relationship by analyzing hyphal tip growth of filamentous fungi growing inside extremely narrow channels of microfluidic devices. We found that most fast-growing hyphae often lost the cell polarity after emerging from the channels, whereas slow-growing hyphae retained polarity and continued growing, indicating a trade-off between growth rate and morphogenesis. These results would help to understand fungal invasive growth into substrates or plant/animal cells, with direct impact on fungal biotechnology, ecology and pathogenicity.

plasticity, velocity, trade-off

発表責任者：山本里穂（s1710749@s.tsukuba.ac.jp）

講演番号：4A01-05
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:00～ ミーティングルーム A

有機塩素系殺虫剤分解能を持つスフィンゴモナッド細菌株の membrane vesicle 形成と vesicle が有する DNA

Membrane vesicle formation and vesicle-related DNA of Sphingomonads capable of degrading organochlorine pesticide

○鈴木 達也[1]、相馬 隆光[2]、加藤 広海[1]、豊福 雅典[3,4]、野村 暢彦[3,4]、永田 裕二[1]([1]東北大学大学院・生命科学研究科、[2]筑波大学大学院・生命環境科学研究科、[3]筑波大学・生命環境系、[4]筑波大学・微生物サステイナビリティ研究センター)
○Tatsuya SUZUKI[1], Takamitsu SOMA[2], Hiromi KATO[1], Masanori TOYOFUKU[3,4], Nobuhiko NOMURA[3,4], Yuji NAGATA[1] ([1]Tohoku Univ. Graduate School of Life Sciences, [2]Tsukuba Univ. Graduate School of Life and Environmental Sciences, [3]Tsukuba Univ. Faculty of Life and Environmental Sciences, [4]Tsukuba Univ. MiCS)

【背景・目的】有機塩素系殺虫剤 γ-hexachlorocyclohexane (γ-HCH) は人体に有害かつ残留性が高いことから環境汚染物質として問題となり、世界各地で γ-HCH を分解する細菌の研究が進められてきた。これまでに単離された分解菌のうち、遺伝子・酵素・ゲノムレベルで解析されている γ-HCH 分解細菌株は、全て *Alphaproteobacteria* に属するスフィンゴモナッド細菌株であり、本細菌群の物質代謝に対する多能性と遺伝的可塑性が示唆されている。しかし分解酵素遺伝子の起源や獲得機構については未知である。細菌は様々な方法で細胞外から遺伝子を獲得するが、近年 membrane vesicle (MV) と呼ばれる膜小胞が介在するケースが報告されている。すなわち、MV がこれまで見過ごされてきた遺伝情報のリザーバーや遺伝子水平伝播装置として機能している可能性が考えられる。そこで本研究では、代表的な γ-HCH 分解資化細菌である *Sphingobium japonicum* UT26 株の MV 産生条件、および MV に DNA が含まれるか検討した。
【結果・考察】常法により UT26 株の培養上清から粒径 100~200 nm 程度の MV が回収され、その量は培養後期ほど多かった。また、MV 画分に γ-HCH 分解酵素遺伝子をコードする DNA 断片が存在することを PCR で確認した。さらに、MV 画分を DNase で十分時間処理をしても分解酵素遺伝子が PCR 増幅されることから、MV 画分に DNase が作用できない DNA が存在することが示された。以上より、(i) グラム陰性細菌の中でも特殊な外膜を持ち、多彩な物質代謝能を有するスフィンゴモナッド細菌株が MV を産出すること、および、(ii) MV 画分に安定な状態の DNA が存在すること、を示し、MV が遺伝情報のリザーバーとして機能する可能性が示唆された。

γ-Hexachlorocyclohexane (γ-HCH) is a halogenated organic insecticide that causes serious environmental problems. The aerobic degradation pathway of γ-HCH in bacterial strain *Sphingobium japonicum* UT26 has been extensively studied. However, the origin and acquisition mechanism of genes for the γ-HCH degradation remain unknown. Recently, there are a few reports on horizontal gene transfer via membrane vesicle (MV). In this study, we demonstrated that (i) UT26 produced MV especially at late growth phase and (ii) MV fraction contained DNA tolerant to the DNase attack. These results suggest that MV may have a role as gene reservoir.

Membrane Vesicle, Sphingomonads, Organochlorine pesticide

発表責任者：鈴木達也（t.suzuki@ige.tohoku.ac.jp）

講演番号：4A01-06
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:00～ ミーティングルーム A

Aspergillus oryzae 菌体内グルタチオン蓄積量に対する光照射の影響

Effect of light to intracellular glutathione level in *Aspergillus oryzae*

○服部 領太、楠本 憲一、鈴木 聡、鈴木 忠宏（農研機構）
○Ryouta HATTORI, Ken-ichi KUSUMOTO, Satoshi SUZUKI, Tadahiro SUZUKI (NARO)

【目的】

Aspergillus oryzae は我が国の伝統的発酵食品の製造において使用される有用糸状菌である。様々な菌類において光応答の研究がなされているが、*A. oryzae* においても光応答することが明らかになってきている。したがって、醸造食品生産工程において、外部刺激による新たな制御技術として光を使用することは有用であると考えられる。一方で過剰な光に曝露されることは生物にとってストレスになる。グルタチオンはチオール基を有するトリペプチドで、あらゆる生物の細胞に普遍的に存在する物質である。その生体内での生理的役割は様々なストレス耐性に関与しており、細胞内グルタチオン量は菌体の生育に影響を及ぼすと考えられる。今回は光の照射によって *A. oryzae* 菌体が受けるストレスと、麹菌菌体内におけるグルタチオン合成について及ぼす影響を検討した。

【結果】

細胞内グルタチオン濃度は光強度を上げることにより上昇した。また、ストレス指標としてのグルタチオンの酸化還元比率を測定したところ酸化型の割合が上昇したことから、*A. oryzae* においても光によってストレスが生じていると考えられる。

Aspergillus oryzae is a filamentous fungus used for the manufacture of traditional fermented foods as miso, shoyu and sake. The production process of traditional Japanese fermented foods has been highly optimized over a long history of revision by predecessors, and thus achieving further improvements in productivity by extension of the prior art of temperature control is difficult. Additional artificially controllable parameters are also necessary and light control may be useful. It is known that excess light causes stress. Glutathione is a tripeptide contained in variety of organisms and is involved in tolerance to various stresses. We investigated into effect of light to glutathione synthesis and stress response in *A. oryzae*.

Aspergillus oryzae, glutathione, light

講演番号：4A01-07
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:00～ ミーティングルーム A

一細胞自家蛍光シグネチャーに基づく非破壊的な油脂生産性の予測

Phenotype Prediction Based on Single-cell Innate Fluorescence Signature Analysis: Tag-less Isolation of lipid producing phenotype as model system

○平山 智弘[1]、八幡 志央美[2]、風間 春香[3]、高久 洋暁[3]、野村 暢彦[2,4]、八幡 穣[2,4] ([1]筑波大院・生命環境科学、[2] 筑波大・生命環境系、[3] 新潟薬科大・応用生命科学、[4] 筑波大・微生物サステイナビリティ研究センター)

○Tomohiro HIRAYAMA[1], Shiomi YAWATA[2], Haruka KAZAMA[3], Hiroaki TAKAKU[3], Nobuhiko NOMURA[2,4], Yutaka YAWATA[2,4] ([1]Grad. Sch. of Life and Environ. Sci., Univ. Tsukuba, [2]Fac. of Life and Environ. Sci., Univ. Tsukuba, [3]Dept. Appl. Life Sci., NUPALS, [4]MiCS, Univ. Tsukuba)

細胞の自家蛍光は細胞内の様々な生体分子が発する自家蛍光の集合体であり、これまでの研究から細胞の整理状態を反映することが知られている。我々の研究グループでは、細胞自家蛍光の解析を集団レベルから一細胞レベルの解析へと発展させる手法 CRIF (confocal reflection microscopy-assisted innate fluorescence signature analysis) を開発し、一細胞の自家蛍光の特徴「自家蛍光シグネチャー」を機械学習モデルに学習させることで増殖段階や種類などを高精度で予測できることを示した。一方で、自家蛍光シグネチャーが、細胞集団内に見られる表現系の不均一性や、物質生産能力をどのように反映するのかは分かっていない。そこで本研究では油糧酵母 *Lipomyces starkeyi* の油脂生産性と自家蛍光シグネチャーの関係を一細胞レベルで詳細に解析した。

細胞集団の自家蛍光を共焦点スペクトル顕微鏡で可視化すると、自家蛍光の特徴は非常に不均一であり、例えば青、緑、赤などの自家蛍光でそれぞれ特徴づけられる亜集団が存在した。本研究では一細胞ごとの自家蛍光と油脂生産性を対応づける新規観察系を構築し、自家蛍光シグネチャーと油脂生産性には明確な関係が存在することが回帰分析などから示された。さらに、油脂生産性の異なる複数の変異株の間でも、同様に自家蛍光から油脂生産ポテンシャルを予測する回帰モデルの構築が可能であった。これらの結果は、自家蛍光シグネチャーに基づいて細胞の油脂生産性を評価し、より有用な一細胞を選抜できる可能性を示している。従来までの化学分析や染色を介する分析と異なり、自家蛍光シグネチャーは非破壊的かつ迅速に一細胞レベルでの評価が可能であることから、より洗練されたスクリーニング手法開発の契機となることが期待される。

Innate fluorescence (IF) signature is an assemblage of autofluorescence emitted by various biomolecules within a cell and known to reflect a single-cell's physiological state. Recently, we have developed a novel technique to characterize innate fluorescence signature at the resolution of single-cell, a step forward compared to traditional population-level IF analysis.

Here, we have explored the feasibility of applying IF signature in expediting cell screening processes, using oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi* as a model system. We firstly characterized the temporal dynamics of autofluorescence in *L. starkeyi*, which reflected the cellular lipid metabolism changing. Both the result of PCA and the machine-learning analysis pointed that the IF signature differs considerably among cells with distinct lipid production phenotypes. Furthermore, we could construct a linear and non-linear regression models that are capable of predicting lipid productivity of each single-cell in a heterogenous population based on IF signature. Taken together, our results demonstrate that CRIF-based analysis allows tag-less prediction of cellular phenotypes, which could serve as a powerful tool to streamline often labor-intensive and time-consuming phenotype screening process.

Autofluorescence, Lipid, Screening

発表責任者：八幡穣（yawata.yutaka.ga@u.tsukuba.ac.jp）

講演番号：4A01-08
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:00～ ミーティングルーム A

糸状菌類を用いたスクアレン高蓄積培養条件の検討

Study for culture system that highly accumulates squalene using filamentous fungi

○須波 和[1]、崎浜 靖子[2]、橋本 誠[2]、橋床 泰之[2] ([1]北海道大農、[2]北海道大院農)
○ Kazu SUNAMI[1], Yasuko SAKIHAMA[2], Makoto HASHIMOTO[2], Yasuyuki HASHIDOKO[2] ([1]Faculty School of Agriculture, Hokkaido Univ., [2]Graduate School of Agriculture, Hokkaido Univ.)

スクアレンは抗酸化作用や抗がん作用が報告されているトリテルペンである。主要な供給源は深海ザメの肝油であるが、スクアレンの需要の増加に伴う乱獲や海洋汚染により、絶滅が危惧されている。そこで、新規供給源としてスクアレンを産生することが知られている糸状菌に着目した。本研究ではスクアレンを酸化するスクアレンエポキシダーゼ阻害剤であるブテナフィンを添加することでスクアレンを高蓄積させる培養系の構築を試みた。

3 種の糸状菌 *Trichoderma virens* PS1-7 株, *Rhizopus oryzae* I-1 株, *R. oryzae* NBRC9364 株を 0～800 μM ブテナフィンを含む PD 液体培地で培養した。その後、培養ろ液と菌体に分け、それぞれ酢酸エチル、アセトンで抽出し、逆相 HPLC に供してスクアレンを定量した。最もスクアレンを多く蓄積する菌株は *T. virens* PS1-7 株であり、ブテナフィン処理区で非処理区の数 100 倍程度の蓄積増加が見られた。一方、*R. oryzae* NBRC9364 株はブテナフィン処理によるスクアレン蓄積量増加が見られず、菌株ごとにブテナフィンに対する応答が大きく異なることが分かった。スクアレン蓄積量増加に向け、さらなる培養条件の検討を進めている。また、ブテナフィンに対する糸状菌類の応答を素早く、簡便に調べるためのプレートアッセイ系の構築を試みている。

Squalene is a triterpene that has been reported to have antioxidant and anticancer effects. The main source of squalene is liver oil from deep-sea sharks, but it is threatened with extinction. Therefore, we focused squalene accumulation of filamentous fungi as a new source. In this study, we attempted to construct a fungal culture system that highly accumulates squalene with using butenafine, an inhibitor of squalene epoxidase.

Three types of filamentous fungi were cultured in PD liquid medium containing 0 to 800 μM butenafine. Then, the cultures were separated into a culture filtrate and cells, extracted, and squalene was quantified with HPLC. By butenafine treatment, *T. virens* PS1-7 accumulated squalene with several hundred times more than control. On the other hand, *R. oryzae* NBRC9364 showed no increase in squalene content. Further studies on culture conditions are underway. We also constructed a plate assay system to investigate the response of filamentous fungi to butenafine quickly.

Trichoderma virens, *Rhizopus oryzae*, triterpene

発表責任者：須波　和（suwave_kazu@eis.hokudai.ac.jp）

講演番号：4A01-09
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:00～ ミーティングルーム A

メタ連続発酵プロセスにおける希釈率が及ぼす影響の解明
Elucidation of effect of dilution rate on continuous meta-fermentation process
○古閑 友紀[1]、関谷 和真[1]、宮本 浩邦[2,3,4]、田代 幸寛[1]、酒井 謙二[1]([1]九大・農、[2]千葉大・園芸、[3]理研・生命化学科、[4]（株）サーマス)
○Tomonori KOGA[1], Kazuma SEKIYA[1], Hirokuni MIYAMOTO[2,3,4], Yukihiro TASHIRO[1], Kenji SAKAI[1] ([1]Kyushu Univ., [2]Chiba Univ., [3]RIKEN for IMS, [4]Sermas co., Ltd.)

当研究室では、複合微生物系を利用し、有価物の発酵生産を行うことをメタ発酵と定義している（Tashiro et al., Bioresour. Technol., 2016）。これまでに、回分発酵法において、使用菌株、栄養源、培養条件などがメタ発酵生産における重要な制御因子であることを明らかにしており、光学活性 L-乳酸、酪酸、フマル酸などの生産に成功している。一方、連続発酵では、独自の制御因子として希釈率があり、その希釈率より比増殖速度の異なる微生物を集積できると考えられる。そこで本研究では、メタ連続発酵プロセスで、希釈率が代謝産物および菌叢に与える影響を解明することを目的とした。

堆肥を種菌として、グルコースを炭素源とする半合成培地にて、希釈率を 0.05 h^{-1}から 0.4 h^{-1}まで (1) および 0.4 h^{-1}から 0.55 h^{-1}まで(2)それぞれ 0.05 h^{-1}ずつ上昇させた連続発酵を行い、代謝産物および細菌叢を解析した。(1) において、0.05 h^{-1}では時間の経過とともに L-乳酸生産濃度および生産菌 *Bacillus coagulans* が減少した。さらに、0.1 h^{-1}に上昇した場合、*B. coagulans* の占有率は 5%以下となり、*Bacillus hisashii* および *Xylanivirga thermophila* が優占菌となり、ギ酸、酢酸、L-乳酸が主生産物であった。一方、(2) において、0.4-0.55 h^{-1}で *B. coagulans* および *B. hisashii* の 2 種で占有率 98.4%以上となり、L-乳酸が主生産物である一方、*X. thermophila* は検出されなかった。以上の結果、高い希釈率で連続発酵を開始することで細菌の選択性が高まり、副生産物割合を減少させ主生産物濃度割合を上昇できる新しい手法を提案した。

We recently proposed meta-fermentation, defined as the fermentative production of valuable substances using mixed culture system (Tashiro et al., Bioresour. Technol., 2016). Several factors including bacterial seeds, nutrients, culture conditions have been elucidated to be significant for meta-fermentation in the batch mode. In continuous mode, dilution rates would be also important because bacteria with low specific growth rates could not exist at higher dilution rates. This study aimed at elucidating the effect of dilution rate on products and bacterial community structure in continuous meta-fermentation.

At the low dilution rate of 0.05 h^{-1}, L-lactate decreased with decreasing in abundances of *B. coagulans* and then, *B. hisashii* and *X. thermophila* became predominant species with productions of acetate, formate, and L-lactate. On the other hand, continuous meta-fermentation from dilution rates of 0.4 h^{-1} enriched *B. coagulans* and *B. hisashii* with >98.4% total abundances at 0.4-0.55 h^{-1} with L-lactate production. These results suggested that the main product formation could be elevated by decreasing by-product concentration.

mixed culture, continuous culture, dilution rate

講演番号：4A01-10
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:00～ ミーティングルーム A

外膜脱離型シアノバクテリア細胞は農作物生産を増進させる物質群を分泌生産する

Outer membrane-deficient cyanobacteria secretes plant growth-promoting compounds

○児島 征司、奥村 泰章（パナソニック（株）テクノロジー本部）
○Seiji KOJIMA, Yasuaki Okumura (Technology Devision, Panasonic)

農作物生産の効率向上と CO_2 の吸収・固定の拡大を両立できる技術開発が望まれている。我々は、外膜をペプチドグリカンに接着させる機能を担う *slr0688* 遺伝子を発現抑制したシアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 外膜脱離変異株が、①光合成により固定された有機炭素の約 50% を培養上清中に分泌し、かつ②当該有機物（約 100 種類のタンパク質および約 40 種類の低分子代謝物）がホウレン草、トマト、イチゴ、トウモロコシ、ペチュニア等の複数の作物種に対し約 1.2～1.6 倍の生産増進効果を有することを見出した。これら作物において成長増進は特に地上部で顕著であり、葉から供給される光合成産物スクロースの利用に寄与する液胞インベルターゼ活性が約 2 倍上昇する。成長増進のための当該有機物添加量は植物一株あたり約 0.5 mL と少量でよく、かつ分泌物であるためシアノバクテリア細胞の回収・破砕を必要としない。従って上記シアノバクテリアを光独立栄養的に培養しその培養液少量を作物に潅注あるいは噴霧する方法により、農作物生産効率が向上し、かつシアノバクテリア及び作物自身の光合成によって空気中 CO_2 の活用拡大が同時に実現できる。

The direct conversion of CO_2 to value-added compounds presents a sustainable solution for reducing green-house gas emissions while enhancing economic activity. Here we discovered that an outer membrane-deficient mutant cyanobacterium *Synechocystis* sp PCC 6803, in which the expression of *slr0688* gene responsible for attaching the outer membrane to the peptidoglycan is repressed, secretes up to 50% of photosynthetically generated total organic carbons and that these organic substances exhibit plant growth-promoting activity. The plant growth-promoting compounds, consist of >100 species of proteins and >35 metabolites, enhanced the yield of various crops such as maize, spinach, lettuce, tomato, or strawberry by ca. 1.5-fold. This growth-promoting effect was characterized by the increased shoot/root ratio and ca. 2-fold enhanced activity of shoot vacuolar invertase which is involved in the photosynthate sucrose metabolism. The growth-promoting activity was obtained either by irrigation or foliar spray administration. Taken together, this mutant cyanobacterium provides a novel approach to generate economic benefits from atmospheric CO_2 by increasing the agricultural production.

cyanobacteria, plant growth-promoting compounds, outer membrane

発表責任者：児島征司（skojima0801@gmail.com）

講演番号：4A01-11
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:00～ ミーティングルーム A

キナ酸からプロトカテク酸を産生するための酢酸菌のペリプラズミック代謝工学
Periplasmic metabolic engineering to produce protocatechuic acid from quinic acid with *Gluconobacter oxydans*.
○永木 翔[1]、松谷 峰之介[2]、片岡 尚也[1,3,4]、松下 一信[1,3,4]、藥師 寿治[1,3,4] ([1]山口大院創成科学、[2]東農大ゲノム解析セ、[3]山口大農、[4]山口大中高温微セ)
○ Kakeru NAGAKI[1], Minenosuke MATSUTANI[2], Naoya KATAOKA[1,3,4], Kazunobu MATSUSHITA[1,3,4], Toshiharu YAKUSHI[1,3,4] ([1]Grad. Sch. Yamaguchi Univ., [2]Tokyo Univ. Agric., [3]Fac. Agr. Yamaguchi Univ., [4]RCTMR Yamaguchi Univ.)

プロトカテク酸はナイロンやポリエチレンテレフタラートのようなポリマーの原料であるムコン酸の前駆物質であり，自身も抗酸化作用を持つ有用な物質である。酢酸菌 *Gluconobacter oxydans* NBRC 3244 は，膜結合型のキナ酸脱水素酵素を持ち，キナ酸を酸化するペリプラズミック酸化系を持つ。生じるデヒドロキナ酸は脱水によってデヒドロシキミ酸へ変換され，さらにデヒドロシキミ酸は脱水によってプロトカテク酸へ変換される。私たちは以前，*G. oxydans* 株にデヒドロキナ酸脱水酵素（DHQase）を発現させ，キナ酸からデヒドロシキミ酸の効率的な生産を可能にした。本研究では *Acinetobacter baylyi* ADP1 株が保有するデヒドロシキミ酸脱水酵素と外膜に存在し，キナ酸輸送体と言われている QuiX の２つのタンパク質を発現する *G. oxydans* 株を構築した。次に，デヒドロシキミ酸生産株と本研究で構築した *G. oxydans* 株を用いて共培養を行った。この 2 株を用いることにより，キナ酸から定量的にプロトカテク酸を生産することができた。一連の変換をペリプラズムで行わせることが、効率的なプロトカテク酸生産になったと考察した。また，QuiX を発現させた株を用いた組み合わせは他の組み合わせよりも速くプロトカテク酸を生産した。
Protocatechuic acid (PCA) is a useful chemical compound that has antioxidant effect and is a raw material for muconic acid, which is a key compound in the synthesis of polymers such as nylon and polyethylene terephtalate. *Gluconobacter oxydans* strain NBRC 3244 specifically possesses the periplasmic oxidation system for quinate to produce 3-dehydroquinate (DQA). Two additional reactions lead DQA to 3-dehydroshikimate (DSA). DQA is dehydrated to DSA by DQA dehydratase (DHQase). Finally, DSA is dehydrated to PCA by DSA dehydratase (DHSase). We constructed the recombinant *G. oxydans* strains that possess relocated DHQase to periplasmic space. This strain achieved efficient DSA production. In this study, we heterologously expressed the *quiCX* gene encoding periplasmic DHSase and outer membrane quinate transporter from *Acinetobacter baylyi* DSM 24193 (ADP1), respectively. Next, we attempted co-culture using the *Gluconobacter* strain expresses *quiC* or *quiCX* and that expresses the relocated DHQase constructed in previous study. The co-culture system efficiently produced PCA. In addition, the use of QuiX enhanced quinate oxidation and PCA production.

acetic acid bacteria, periplasm, protocatechuate

講演番号：4A01-12
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:00～ ミーティングルーム A

グルコノバクター属酢酸菌の膜結合型グルコース脱水素酵素によるラクトビオン酸生産と二糖類酸化の改善

Improvement of lactobionic acid production and disaccharide oxidation with membrane-bound glucose dehydrogenase of *Gluconobacter* sp.

○内田 侑里[1]、ケオケン トラポン[2]、片岡 尚也[1,3,4]、松下 一信[1,3,4]、薬師 寿治[1,3,4]([1]山口大院創成科学、[2]ラオス国際大学自然科学、[3]山口大農、[4]中高温微研セ)
○Yuri UCHIDA[1], Toulaphone Keokene[2], Naoya Kataoka[1,3,4], Kazuobu Matsushita[1,3,4], Toshiharu Yakushi[1,3,4] ([1]Graduate School of Sciences and Technology for Innovation, Yamaguchi Univ, [2]Faculty of Natural Science, National Univ. of Laos, [3]Faculty of Agriculture, Yamaguchi Univ, [4]RCTMR, Yamaguchi Univ)

酢酸菌は様々な糖やアルコール類を酸化することのできる特有の機能を持っており、酢酸菌の代謝反応は酵素の働きによるものである。私たちは PQQ 依存性膜結合型酵素、特にグルコース脱水素酵素(GDH)のラクトース、セロビオース、マルトース、イソマルトースのような二糖類の酸化反応について解析している。これらの二糖類は GDH によってラクトビオン酸などの対応する各有機酸へと酸化される。ラクトビオン酸は食料品や保湿剤に使用される有用な物質であり、現在は化学合成によって生産されている。しかしながら GDH によるラクトース酸化はグルコース酸化に比べると非常に遅く、効率的なラクトビオン酸生産のためには GDH の過剰発現が必要とされる。そこでプラスミドベクターを使用した GDH 過剰発現株を構築し、ラクトビオン酸生産の高速化を試みたが GDH の高発現が酢酸菌 *Gluconobacter frateurii* CHM43 株の生育を不安定にさせた。次に発現量の異なるプラスミドを用い、その GDH 比活性と生育安定性を評価した。その内、最も生育が良くかつ安定していた株を選択し、ラクトビオン酸生産効率と GDH の機能解析を行った。この株はラクトビオン酸の生産でき、その効率は 1.05mM/h であった。また Km 値はグルコースで 9.39 mM, ラクトースで 677.47 mM

Acetic acid bacteria have unique function that oxidize various sugars and alcohols. We analyzed PQQ-dependent membrane bound enzymes, especially glucose dehydrogenase about the oxidization of the disaccharides such as lactose, cellobiose, maltose, Isomaltose. These disaccharides are oxidized by GDH to each organic acid containing lactobionic acid. Lactobionic acid is a useful substance used in foods and humectants and currently produced by chemical synthesis. However, the lactose oxidation by GDH is much slower than glucose oxidation, and overexpression of GDH is required for efficient production of lactobionic acid. In previous study, it has revealed that the expression level of GDH have an effect on the growth stability of *Gluconobacter frateurii* CHM43. In this study, GDH-overexpression strains using some plasmid vectors which show different expression level were constructed. In those strains, the strain that could grow well and stable was selected to evaluate specific GDH activity value, and the stability of growth. This strain could product lactobionic acid, then its efficiency was 1.05 mM/h. The Km value for glucose and lactose were 9.39 mM and 677.47 mM, respectively.

Gluconobacter, Lactobionic acid, Glucose dehydrogenase

講演番号：4A01-13
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:00～ ミーティングルーム A

Molybdopterin dependent AldFGH aldehyde dehydrogenase plays a major role on acetaldehyde oxidation in acetic acid fermentation by *Gluconacetobacter diazotrophicus*

○RONI MIAH[1], Takeru Murate[1], Naoya Kataoka[1,2,3], Kazunobu Matsushita[1,2,3], Toshiharu Yakushi[1,2,3] ([1]Grad. Sch. Sci. Tech. Innov., Yamaguchi Univ., [2]Fac. Agric., Yamaguchi Univ., [3]RCTMR, Yamaguchi Univ.)

Acetic acid fermentation involves the oxidation of ethanol to acetic acid via acetaldehyde as the intermediate, and is catalyzed by the membrane-bound alcohol dehydrogenase (ADH) and aldehyde dehydrogenase (ALDH) of acetic acid bacteria. Although ADH depends on pyrroloquinoline quinone (PQQ), the prosthetic group associated with ALDH remains a matter of debate. This study aimed at addressing the dependency of ALDH of *Gluconacetobacter diazotrophicus* strain PAL5 on PQQ, and the physiological role of ALDH in acetic acid fermentation by reverse genetic study. *Ga. diazotrophicus* PAL5 possesses two gene clusters for ALDH, *aldFGH* and *aldSLC* in the genome. We constructed deletion mutant strains for both the ALDH gene clusters of PAL5, *aldFGH* and *aldSLC*. In addition, the *adhAB* operon for ADH was eliminated, since it shows ALDH activity. The triple deletion derivative Δ*aldFGH* Δ*aldSLC* Δ*adhAB* failed to show ALDH activity, which suggested that ALDH activity in PAL5 is derived from these three enzyme complexes. Since the single gene-cluster deletion derivative Δ*aldFGH* lost most ALDH activity and accumulated much higher acetaldehyde than wild-type under acetic acid fermentation conditions, we concluded that AldFGH functions as the major ALDH in PAL5. Furthermore, deletion of the PQQ biosynthesis gene cluster (*pqqABCDE*) abolished ADH activity completely, but did not affect ALDH activity. Instead, the molybdopterin biosynthesis gene deletion derivatives lost most ALDH activity. Thus, we concluded that the AldFGH and AldSLC complexes of *Ga. diazotrophicus* PAL5 require a form of molybdopterin but not PQQ for ALDH activity. In addition, the Δ*adhAB* strain that lost ADH activity as expected could produce acetic acid in a low amount. We hypothesized that it may be derived from cytoplasmic acetic acid fermentation process, because we observed the presence of cytoplasmic NAD^+-ADH and $NADP^+$-ALDH activity in both the wild-type and Δ*adhAB* strains. Two enzyme activities in the Δ*adhAB* strain were higher than the wild-type. Interestingly we observed this strain show $NADP^+$-ADH activity that is unique from other acetic acid bacteria. We are currently attempting to purify AldFGH for biochemical characterization.

Acetic acid fermentation, *Gluconoacetobacter diazotrophicus*, Membrane-bound aldehyde dehydrogenase

発表責任者：Toshiharu YAKUSHI（juji@yamaguchi-u.ac.jp）

講演番号：4A01-14
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:00～ ミーティングルーム A

Gluconobacter japonicus NBRC 3271 を宿主とした効率的 5-ケトグルコン酸生産技術の開発

Efficient production of 5-ketogluconate by *Gluconobacter japonicus* NBRC 3271

○直木 琴音[1]、片岡 尚也[1,2]、藥師 寿治[1,2]、松下 一信[1,2] ([1]山口大院創成科学、[2]山口大中高温微セ)
○Kotone NAOKI[1], Naoya KATAOKA[1,2], Toshiharu Yakushi[1,2], Kazunobu Matsushita[1,2] ([1]Grad. Sch. Sci. Tech., Yamaguchi Univ, [2]RCTMR,Yamaguchi Univ)

Gluconobacter 属酢酸菌は，細胞膜上に多種多様な膜結合型脱水素酵素を保有しており，さまざまな糖やアルコールを不完全に酸化する。この特徴的な代謝形態は，古くから食酢製造やビタミン C 生産に利用されてきた。本研究では，*Gluconobacter japonicus* NBRC 3271 を宿主とした効率的 5-ケトグルコン酸 (5KGA) 生産技術の開発を目指した。まず細胞外代謝に着目し，主要な副産物である 2-ケトグルコン酸生成を担う 2 つの膜結合型グルコン酸脱水素酵素 (GndFGH, GndSLC) を不活化させた株を作製し試験した。その結果 5KGA の生成が確認されたが，培養を継続すると資化されることが明らかになった。そこで，細胞内でのグルコン酸と 5KGA の代謝に関わる初発酵素，グルコノキナーゼ (GntK) および 5KGA 脱水素酵素 (Gno) をさらに不活化させた株を作製した。この変異株を同様の方法で培養したところ 5KGA の蓄積は継続され，収率は 0.85 mol/mol glucose であった。更なる効率化を目指し，グルコースからの 5KGA 変換を触媒するキノプロテインの活性に影響を与えることが知られている Ca^{2+}の添加の影響を調査した。その結果，2.5 mM の $CaCl_2$ の添加により，収率は理論値である 1.0 mol/mol glucose に達した。

Gluconobacter spp. is the group of acetic acid bacteria possessing various membrane-bound dehydrogenases responsible for the oxidation of a wide variety of sugars and alcohols. This ability has been used in industrial fields, for instance, production of vitamin C and vinegar brewing. In this study, we aimed to develop the technology for efficient 5-ketogluconate (5KGA) production by *Gluconobacter japonicus* NBRC 3271. First, two membrane-bound gluconate dehydrogenases (GndFGH, GndSLC) responsible for the formation of 2KGA, a main by-product of 5KGA production, were inactivated. When Δ*gndFGH* Δ*gndSLC* (ΔΔ) was cultured, 5KGA was produced, however, it was utilized thereafter. To minimize the intracellular metabolism of gluconate and 5KGA, gluconokinase (GntK) and 5KGA dehydrogenase (Gno) were further inactivated. When the ΔΔΔ*gno* Δ*gntK* was cultured, 5KGA was accumulated and no consumption was observed, and the yield was reached to 0.85 mol/mol glucose. To further improve 5KGA production, the effects of addition of Ca^{2+}, which is known to affect the activity of quinoproteins catalyzing the conversion of glucose to 5KGA, were investigated. When 2.5 mM $CaCl_2$ was added, the yield was increased to almost 1.0 mol/mol glucose, which is the theoretical value.

Gluconobacter japonicus, 5-ketogluconate

講演番号：4A03-01
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:00～ ミーティングルーム A

Replication-Cycle Reaction 法による環境試料中の環状 DNA の検出とその塩基配列の解読

Novel plasmids were isolated from natural environmental samples using Replication-Cycle Reaction (RCR)

○森 光矢[1]、奈良 聖亜[2]、末次 正幸[2]、金原 和秀[1]、新谷 政己[1,3]([1]静大院・総合科技、[2]立教大院・理、[3]静大・グリーン研)
○ Mitsuya MORI[1], Seia NARA[2], Masayuki SU’ ETSUGU[2], Kazuhide KIMBARA[1], Masaki SHINTANI[1,3] ([1]Grad. Sch., Shizuoka Univ., [2]Grad. Sch., Rikkyo Univ., [3]RIGST, Shizuoka Univ.)

プラスミドは微生物の進化や環境への適応に深く寄与する染色体外遺伝因子である．しかし，実環境中の「どこ」に「どのような」プラスミドが存在するのかは未だ不明である．これに対し，近年はメタゲノム配列を解読する方法が広くとられるが，プラスミド以外の DNA が大量に混入する上，その全長を明らかにするには，既存のプラスミドの塩基配列情報に依存するため，新たなプラスミドを見出すには必ずしも適していない．我々は，環境試料中からプラスミド DNA を網羅的に検出・収集する方法の開発に取り組んでいる．具体的には，環境試料から全 DNA またはプラスミド DNA 抽出を行った後，Replication-Cycle Reaction（RCR）法 (1) によって環状 DNA のみを増幅させ，その増幅産物の塩基配列を解読した．現在までに，活性汚泥および牛糞堆肥から，2-40 kb の環状 DNA の抽出・増幅に成功し，複数の全く新たな環状 DNA の塩基配列も得られた．うち 3 本に関しては完全長塩基配列の取得に成功し，そのうち 1 本には，プラスミドの複製に関与する推定遺伝子が存在した．また唯一データベース上に登録されているプラスミド pRGRH0632（accession number: LN853259.1）と類似の配列を持つ断片も得られた．以上から，本手法が実環境中に存在するプラスミドを検出・収集することに有効であることが示唆された．現在は，他の環状 DNA についても塩基配列の解読を進めるとともに，発見した環状 DNA が他の環境試料中に存在するかどうか検証している．

The spread of plasmids contributes to microbial evolution and adaptation. Nonetheless, it is unknown “which” plasmids exist “where” in microbial ecosystems. A metagenomic approach has widely used to determine the nucleotide sequences of non-culturable microbes. Several DNA fragments of new plasmid sequences have been obtained, but recovery of full-length-sequences of plasmids is still difficult to get from the metagenomic approach. Here, we developed a new approach to isolate plasmids from environmental samples using Replication-Cycle Reaction (RCR)(1). Isolation of circular DNAs in environmental samples were performed by extracting total DNAs, amplifying only circular DNAs by the RCR, and sequencing the resultant amplicons. Circular DNAs of 2-40 kb were obtained from environmental samples including activated sludge and cow manure. The full-length-sequences of three circular DNAs were successfully obtained, one of them showed high similarity with pRGRH0632 (accession number: LN853259.1, whose sequences were discovered in the metagenome of rat cecum), suggesting that our approach could obtain overlooked plasmids. Currently, nucleotide sequences of the other circular amplicons are being determined. 1) Su'etsugu et al., 2017, Nucleic Acids Res. 45(20):11525-11534.

Plasmid, Replication-Cycle Reaction, Plasmidome

発表責任者：新谷政己（shintani.masaki@shizuoka.ac.jp）

講演番号：4A03-02
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:00～ ミーティングルーム A

多摩川流域における薬剤耐性遺伝子の伝播を担うプラスミドの収集と比較

Spreading of drug resistance genes by conjugative plasmids in the Tama river in the megapolis city Tokyo.

○中道 孝一朗[1]、金子 健成[1]、森 光矢[1]、森内 良太[2]、道羅 英夫[2]、金原 和秀[1]、二又 裕之[1,2]、新谷 政己[1,2] ([1]静岡大院・総合科技、[2]静岡大・グリーン研)

○Koichiro Nakamichi[1], Kensei Kaneko[1], Mitsuya Mori[1], Ryota Moriuchi[2], Hideo Dora[2], Kazuhide Kimbara[1], Hiroyuki Hutamata[1,2], Masaki Shintani[1,2] ([1]Grad. Sch. Shizuoka Univ., [2]Shizuoka Univ. RIGST.)

プラスミドは，異なる細菌間を接合伝達によって伝播し，宿主の形質を変化させることが可能な染色体外遺伝因子である．薬剤耐性遺伝子の伝播を担うプラスミドは，多剤耐性菌の出現や蔓延にも寄与するため，自然界におけるプラスミドの伝播機構を解明することは多剤耐性菌の蔓延を防ぐ上で重要である．しかし，自然界でどのプラスミドがどの細菌間で薬剤耐性遺伝子の伝播に寄与するのか，その実態は明らかにされていない．我々は，巨大都市を流れる多摩川流域と，そのほかの環境からプラスミドを収集し，これまでに107のプラスミドの全塩基配列の解読を行ってきた．その結果，20種類の環境試料のうち，多摩川，信濃川と洞海湾の底泥試料および下水処理場の活性汚泥から，βラクタム系やアミノグリコシド系の抗生物質に対する耐性遺伝子(群)を搭載するプラスミドを17本取得し，その全塩基配列を決定した．17本のうち11本は多摩川流域由来であり，IncAまたはC（P-3），IncN，IncP (P-1)群に属するプラスミドや，IncQ(P-4)とIncG/U（P-6）群のプラスミドが融合したマルチレプリコンプラスミドであった．これらの結果は，多摩川流域では，複数種のグループに属するプラスミドが薬剤耐性遺伝子の伝播を担っていることを示唆している．現在，多摩川流域より得られた複数種のプラスミドについて，その分布状況を調べるとともに，その接合伝達頻度や宿主域について比較を行っている．

Plasmids attribute to occurrence and spread of multidrug-resistant bacteria. Therefore, understanding the mechanism of drug resistance gene transmission by conjugative plasmids is important for preventing the spread of multidrug-resistant bacteria. Exogenous plasmid capturing was performed with microbes in natural environments and the whole nucleotide sequences of the 107 plasmids were determined. Seventeen plasmids were found to carry β-lactam- and aminoglycoside- antibiotic resistance genes, which were obtained from activated sludge and sediment samples. Among them, eleven plasmids were obtained from the Tama river. They belonged to IncA and C (P-3), IncN, IncP (P-1), and one of them was a fusion plasmid with IncQ(P-4) and IncG/U(P-6) plasmids. These results suggest that several kinds of plasmids are involved in the spread of antibiotic resistance genes in the Tama river. Now the distribution of these plasmids among environment, transfer frequency and host range of them are being investigated and compared.

plasmid, conjugation, multi-drug resistance

発表責任者：中道孝一朗（nakamichi.koichiro.16@shizuoka.ac.jp）

講演番号：4A03-03
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:00～ ミーティングルーム A

グラム陽性菌を対象とした RP4 系プラスミドの接合伝達における *oriT* 最小領域の特定

Identification of the minimal region of *oriT* in the conjugation of RP4 plasmids to Gram-positive bacteria

○深田 悠太[1]、猪又 俊輔[2]、片岡 正和[1] ([1]信州大院・生命医工、[2]信州大工・物質化学)
○Yuta Fukada[1], Shunsuke Inomata[2], masakazu Kataoka[1] ([1]Dept. of Biomed., Grad. Sch of Sci and Tech., Shinshu Univ, [2]Dept. Mat. Chem., Fac. Eng., Shinshu Univ.)

RP4（RK2）は IncP 群に属する接合伝達性プラスミドであり、広範な種への接合伝達が可能であることが報告されている。RP4 の接合伝達は RP4 上に存在する *oriT* と呼ばれる領域に、リラクゼース活性を有する蛋白質複合体が結合することで開始される。この *oriT* は 350bp 程度の領域であり、その配列中に複数の蛋白質と相互作用する部位が存在することが明らかになっている。しかし RP4 の接合伝達においては必ずしも *oriT* の完全な配列は必要ではなく、*oriT* 中の一部領域を欠損させた場合であっても、十分に伝達が達成されることが報告されている。このことから RP4 の接合伝達における *oriT* の機能的な最小領域は 112bp 程度であるとされてきた。一方で、これらの報告はほとんどが大腸菌間、あるいは大腸菌に近しい種間での接合伝達における例である。グラム陽性菌のような、一般的に RP4 系の接合伝達効率が低い傾向にある菌株を対象とした場合、*oriT* の機能的な最小領域は異なる可能性が存在する。

本研究では、*oriT* の部分的な欠損がグラム陽性菌を対象とした RP4 の接合伝達に与える影響の確認を目的とした。*oriT* を部分的に欠損させた断片を組み込んだプラスミドを作成し、それらを大腸菌へと形質転換により導入した後、グラム陽性菌である *B. subtilis* 及び *S. lividans* と混合培養し、接合伝達の達成頻度を確認した。結果として、グラム陽性菌を対象とした接合伝達においては *oriT* の全長が十分な伝達に必要であり、*oriT* 中の蛋白質結合部位を欠損させるにつれ伝達効率が減少することが判明した。さらに従来大腸菌間の接合伝達における最小領域とされていた 112bp 断片を導入したプラスミドは伝達がほとんど確認されなかった。

RP4 (RK2) is a conjugative plasmid belonging to the IncP family and has been reported to be capable of conjugation to a wide range of species. RP4 conjugation is initiated by binding of a protein complex with the relaxase activity to a region called *oriT*, which resides on RP4. The functional minimum region of this *oriT* has been shown to be about 112 bp for conjugation between *E. coli*. On the other hand, the minimum region of *oriT* in conjugation to Gram-positive bacteria has not been elucidated. This study shows that the conventional 112 bp *oriT* does not function for the conjugation to Gram-positive bacteria and 350 bp, full length of *oriT* is required for the frequent conjugation to these bacteria.

Conjugation, RP4, *oriT*

発表責任者：深田悠太（19bs111d@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：4A03-04
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:00～ ミーティングルーム A

Acidithiobacillus ferrooxidans における CRISPR システムを用いた遺伝子発現抑制技術の開発

Development of knockdown system by CRISPR system for *Acidithiobacillus ferrooxidans*

○山田 祥平、高妻 篤史、渡邉 一哉（東薬大生命）
○Shohei YAMADA, Atsushi KOUZUMA, Kazuya WATANABE (Tokyo Univ. Pharm. Life Sci.)

鉄酸化独立栄養細菌 *Acidithiobacillus ferrooxidans* は古くからバイオリーチングで工業利用されており、近年空気と電気を主原料にした持続的物質生産系のホストとしての利用が期待されている。しかし、本株は遺伝子操作が困難であり、遺伝子機能の解明や分子育種がほとんど行われていない。そこで本研究ではゲノム編集法（CRISPR/Cas9）の応用技術である CRISPR 干渉法（CRISPRi）を用いて、*A. ferrooxidans* の遺伝子発現抑制技術の開発を試みた。本研究では CRISPRi の標的遺伝子として *draT*（ニトロゲナーゼの翻訳後修飾因子）および *cyc2*（鉄酸化に関与する外膜シトクロム）を選定した。まず、広宿主プラスミド pBBR1MCS-2 に、ヌクレアーゼ活性を欠損させた Cas9（dCas9）をコードする遺伝子、および標的遺伝子に対する single-guide RNA をコードする配列をクローニングした。次に構築したプラスミドを接合伝達によって *A. ferrooxidans* へ導入したところ、これらのプラスミドを保持した形質転換体（Kd_*draT* 株と Kd_*cyc2* 株）を得ることに成功した。Kd_*cyc2* 株の表現型を調査した結果、対照株と比較して鉄の酸化速度が顕著に低下していた。また Kd_*cyc2* 株を電気培養（電極から還元力を供給する培養）した結果、対照株よりも発生する電流量が低下していた。以上の結果は、*cyc2* の発現抑制によって鉄の酸化と細胞内への電子の取り込みが抑制されたことを示している。今後は Kd_*cyc2* 株および Kd_*draT* 株の表現型をさらに詳細に解析していく予定である。

Acidithiobacillus ferrooxidans is an iron-oxidizing chemolithotroph that has been used for bioleaching of precious metals and is considered to be applicable to bioelectrochemical production of value-added chemicals. Owing to its genetic inaccessibility, however, genetic engineering of *A. ferrooxidans* is difficult. In this study, we developed a CRISPRi system that can specifically repress the expression of target genes in *A. ferrooxidans*. We constructed two mutant strains, Kd_*cyc2* and Kd_*draT*, in which the *cyc2* gene (encoding an outer-membrane cytochrome for Fe^{2+} oxidation) and the *draT* gene (encoding a protein for post-translational modification of nitrogenase) are repressed. Cultivation of Kd_*cyc2* in liquid media containing Fe^{2+} revealed that the rate of Fe^{2+} oxidation in this mutant was markedly slower than that in the control strain. Electrochemical cultivation of Kd_*cyc2* also showed that this mutant generated lower current than that of the control strain. These results indicate that the CRSPRi system developed in this study repressed the expression of *cyc*2, thereby inhibiting Fe^{2+} oxidation and electron uptake by *A. ferrooxidans*.

Acidithiobacillus ferrooxidans, Chemolithotroph, CRISPR interference

発表責任者：山田祥平（s19805@toyaku.ac.jp）

講演番号：4A03-05
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:00～ ミーティングルーム A

鉄硫黄酸化細菌 *Acidithiobacillus ferrooxidans* を宿主とした組換え発現系の構築

Recombinant gene expression in iron- and sulfur-oxidizing bacterium, *Acidithiobacillus ferrooxidans*

○金尾 忠芳[1]、扇元 修志[1]、國久 智紀[2]、田村 隆[1]、上村 一雄[1]([1]岡山大院・環境生命、[2]岡山大農)
○Tadayoshi Kanao[1], Shuji Ogimoto[1], Took Kunihisa[2], Takashi Tamura[1], Kazuo Kamimura[1]
([1]Grad. School. Environ. & Life Sci., Okayama Univ., [2]Facul. Agri., Okayama Univ.)

【背景・目的】鉄硫黄酸化細菌 *Acidithiobacillus ferrooxidans* は，pH 2~3 の強酸性条件下で二価鉄や還元型無機硫黄化合物を酸化し，得られた還元力によって二酸化炭素を固定して生育する好酸性の化学合成独立栄養細菌である。我々は本菌の硫黄代謝を研究する過程で，還元型無機硫黄化合物の一種であるテトラチオン酸を基質として生育した際に高発現するテトラチオン酸ハイドロラーゼ遺伝子（*Af-tth*）とこの発現を制御するプロモーター（*Af-tth*P）を同定した。本研究では，この *Af-tth*P を利用した *A. ferrooxidans* を宿主とした高発現遺伝子組み換えベクターを構築した。
【方法と結果】既に同定した *Af-tth*P プロモーターを含む領域を PCR 増幅し，緑色蛍光タンパク質（GFP）遺伝子と接続した（*tth*P-*gfp*）。広宿主域接合伝達プラスミド pJRD215 は 10 kbp を超える比較的サイズの大きいプラスミドであるため、本研究において不要な領域を除去・縮小したプラスミド pMPJC（約 6.3 kbp）を構築し，導入効率を高めた。これに *tth*P-*gfp* を挿入して構築した *gfp* 発現ベクターpMPJC-TG を接合伝達によって本菌への導入を試みた。この結果，*Af-tth*P プロモーター領域を含む構築した発現ベクターを保有する形質転換体のコロニーにおいて，緑色蛍光が観察された。さらに，*Af-tth* 遺伝子の停止コドンの直前に 6×His コドン（His タグ配列）を付与した改変型 *Af-tth* 遺伝子を *Af-tth*P プロモーターと結合し本菌に導入したところ，C-末端に His タグが付与された *Af*-Tth を活性型酵素として組換え発現させることができた。本研究において，同一種による組換え発現で本来の機能をもつタンパク質にアフィニティータグや部位特異的変異を導入することのできる手法を開発したことで，*A. ferrooxidans* の標的タンパク質を目的に合わせて改変し，組換え発現させることにより機能解析を行うことが可能になった。

Acidithiobacillus ferrooxidans is an extremely acidophilic chemolithoautotrophic iron- and sulfur-oxidizing bacterium. We have already identified the tetrathionate hydrolase gene (*Af-tth*) and the promoter for *Af-tth* gene expression. This promoter highly active in the tetrathionate grown *A. ferrooxidans* cells was named as *Af-tth*P for convenience. We constructed a new vector plasmid pMPJC which was removed unnecessary regions from broad host range plasmid pJRD215. The gene encoding green fluorescent protein (*gfp*) was under the control of *Af-tth*P and the gene inserted into pMPJC. The constructed vector pMPJC-tp-gfp was introduced into *A. ferrooxidans* cells. As the green fluorescence could be detected in the recombinant cells grown on tetrathionate, heterologous expression was successful in this bacterium. Furthermore, His-tagged and active *Af*-Tth could be obtained by homologous expression of the *Af-tth* gene with His-tag codon introduced upstream of the stop codon. The recombinant active *Af*-Tth can be rapidly purified by Ni affinity chromatography.

recombinant expression, sulfur metabolism, tetrathionate hydrolase promoter

発表責任者：金尾忠芳（tkanao@okayama-u.ac.jp）

講演番号：4A03-06
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:00～ ミーティングルーム A

好塩性セルラーゼ生産菌の探索と諸性質の解析

Search for halophilic cellulase-producing bacteria and analysis of various properties

○柳沢 圭吾[1]、伊藤 翼[1]、嶋根 康弘[2]、峯岸 宏明[1,2] ([1]東洋大学、[2]海洋研究開発機構)
○KEIGO YANAGISAWA[1], TSUBASA ITO[1], YASUHIRO SHIMANE[2], HIROAKI MINEGISHI[1,2] ([1]Toyo Univ, [2]JAMSTEC)

高度好塩菌は増殖に 2.5 M 以上の NaCl を要求する微生物で，そのほとんどは Halobacteria 綱に分類される古細菌である。それらが生産する好塩性酵素は高塩濃度環境下や有機溶媒耐性などの耐環境性に優れている。耐/好塩性微生物が生産するセルラーゼは工業分野での新たな利用が期待できると考えられる。そのため 668 種類の市販塩サンプルから好塩性セルラーゼ生産菌の探索を行った。その結果 5 株で高い活性を示し，中でも 434sel4，434sel6，434sel7 は 16S rRNA 遺伝子塩基配列に基づく系統解析の結果，*Halosiccatus* 属に近縁の新属であることが分かった。得られた候補株由来のセルラーゼは NaCl 濃度 20～30%，pH 7.0～8.0，50～70℃付近に最大活性を示した。既知の好塩性古細菌由来のセルラーゼに比べて，至適 NaCl 濃度が高く飽和に近い NaCl 濃度でも活性を有していた。このことから既知種のセルラーゼとは異なる新規性の高いセルラーゼであることが示唆される。

本講演では上記の研究とともに，今現在おこなっている酵素精製に向けての条件検討を発表したい。

Haloarchaea are microorganisms that require 2.5 M or more of NaCl for growth, and most of them are archaea classified in the class Halobacteria. The halophilic enzymes produced by them are excellent in environmental resistance such as high salt concentration environment and organic solvent resistance. Cellulase produced by halophilic and salt-tolerant microorganisms is expected to be newly used in the industrial field. Therefore, halophilic cellulase-producing bacteria were searched for from 668 types of commercially available salt samples. As a result, 5 strains showed high activity, and among them, 434sel4, 434sel6, and 434sel7 were found to be a new genus closely related to the genus *Halosiccatus* as a result of phylogenetic analysis based on the 16S rRNA gene sequence. The cellulase derived from the obtained candidate strain showed maximum activity at a NaCl concentration of 20 to 30%, a pH of 7.0 to 8.0, and a pH of 50 to 70 ° C. Compared with the known cellulase derived from halophilic archaea, the optimum NaCl concentration was high and the activity was high even at a NaCl concentration close to saturation. This suggests that it is a highly novel cellulase different from the known cellulases.

In this conference, in addition to the above research, we present the conditions for enzyme purification that are currently underway.

Halophile archaea, Cellulase, Halophile enzyme

講演番号：4A03-07
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:00～ ミーティングルーム A

好塩性古細菌 *Halorubrum* sp. 176-9, 590-2 の UV 耐性メカニズム解析

UV resistance mechanism analysis of halophilic archaea *Halorubrum* sp. 176-9 and 590-2

○小宮山 寿紗[1]、嶋根 康弘[2]、峯岸 宏明[1,2] ([1]東洋大学、[2]海洋研究開発機構)
○Kazusa KOMIYAMA[1], Yasuhiro SHIMANE[2], Hiroaki MINEGISHI[1,2] ([1]Toyo Univ., [2]JAMSTEC)

高塩濃度環境に生息する好塩性古細菌は，乾燥に対しても抵抗性を有し電離放射線にも強い耐性を有する菌株の報告例もあることから，宇宙環境曝露実験などに応用されている．しかしながら，高度好塩性古細菌の紫外線抵抗性メカニズムは未だ明確に解明されていない．強い紫外線抵抗性を有する好塩性古細菌を分離するため，国内外の市販塩サンプル 810 種類からスクリーニングを行い，UV-C, B に耐性を示した 2 株を獲得した．この 2 株は 16S rRNA 遺伝子塩基配列解析の結果，*Halorubrum* 属に近縁の菌株である事が分かり，そのうち 1 株は新種の可能性を見出した．これら菌株の紫外線抵抗性メカニズムを解析するため，DNA 切断活性を有する Bleomycin，2 本鎖 DNA 鎖間架橋形成活性を有する Mitomycin C を用い，DNA 合成阻害(変異原)に対する感受性試験を実施したところ，両株とも Bleomycin に耐性を示したことから，Bleomycin 耐性遺伝子を有すると考察している．また，紫外線誘発性損傷をヌクレオチド除去修復することで知られている Uvr 遺伝子を 2 株に対し PCR スクリーニングしたところ，両株とも Uvr 遺伝子を有することが分かった．

本公演では，上記の研究と，分離獲得した 2 株が他の既知株よりも明らかに強い抵抗性を有する事についての考察を発表したい．

Haloarchaea have been reported to be strains that are resistant to drought and resistant to ionizing radiation, so they are applied to space environment exposure experiments. However, the UV resistance mechanism of haloarchaea has not yet been clarified. In order to isolate haloarchaea with strong UV resistance, screening was performed from 810 types of commercially available salt samples, and two strains showing resistance to UV-C and B were obtained. As a result of 16S rRNA gene sequence analysis, these two strains were found to be closely related to the genus *Halorubrum*, and one of them was found to be a new species. In order to analyze the UV resistance mechanism of these strains, we conducted a susceptibility test against DNA synthesis inhibition (mutagen) using Bleomycin (DNA cleaving activity), and Mitomycin C (ICL activity). Two strains showed resistance to bleomycin, it is considered that they have a bleomycin resistance gene. In addition, PCR screening of two strains of the *uvr*, which is known to repair UV-induced damage by nucleotide excision, revealed that two strains have the *uvr*. In this conference, We present the above research and consideration on the fact that the two strains obtained separately have clearly stronger resistance than other known strains.

Halophilic archaea, UV resistance, Haloarchaea

発表責任者：小宮山寿紗（kzs.kk1@gmail.com）

講演番号：4A03-08
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:00～ ミーティングルーム A

強酸性環境からの微生物の培養と分離
Isolation of microorganisms from acidic environments
○友居 昌慶[1]、加藤 真悟[2]、伊藤 隆[2]、平井 美穂[3]、高木 善弘[3]、布浦 拓郎[3]、大熊 盛也[2]、跡見 晴幸[1] ([1]京大院工・合成生化、[2]理研 BRC-JCM、[3]海洋機構)
○ MASAYOSHI TOMOI[1], SHINGO KATO[2], TAKASHI ITOH[2], MIHO HIRAI[3], YOSHIHIRO TAKAKI[3], TAKURO NUNOURA[3], MORIYA OHKUMA[2], HARUYUKI ATOMI[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Riken, [3]JAMSTEC)

高温・強酸性・高塩濃度などの極限環境に生息する微生物は、穏和な環境に生息する微生物とは異なる生育特性や機能を示す場合もあり、学術的にも産業的にも興味深い存在である。しかし、これら極限環境微生物に限らず地球上の多数の微生物は未だ分離培養されておらず、それらの特性については未解明の部分が多い。本研究では、これまでに微生物の分離培養の報告が少ない火山地帯である青森県恐山にて、様々な温度、pH の環境から試料を採取し、そこに生息する微生物の分離・培養および同定を試みた。

恐山には強酸性の水環境が点在しており、ここから温度 12～84℃、pH1.0～6.0 の環境試料（水・泥）を採取し、培養に供した。ここでは有機物を含む培地を用いた好気培養の結果について報告する。温度 28～90℃、pH1.0～4.0 で培養を試みたところ、これまでに 28～85℃、pH2.0～4.0 の条件において微生物の増殖が観察された。28℃、pH2.0 の条件では *Acidiphilium* 属・*Sulfobacillus* 属などに近縁な細菌、28℃、pH4.0 では *Thiomonas* 属・*Acidiphilium* 属・*Metallibacterium* 属細菌および真菌類の 1 種などが分離できた。50℃、pH2.0 では、*Sulfobacillus* 属細菌が得られた。現在はこれら微生物の生育特性を明らかにしており、併せて報告する。

Extremophiles such as those thriving in environments of high temperature, acidic pH and high salt concentrations exhibit features not found in classical microorganisms. They are of interest from both biological and biotechnological aspects. A major portion of microorganisms in our environment have not been cultivated nor isolated, and this also applies for extremophiles.

In this study, we collected samples from acidic environments found in Aomori prefecture, Japan. The temperatures at these sites ranged from 12 to 84°C and the pH varied from 1.0 to 6.0. Cultivation was carried out with organic substrates under an aerobic atmosphere. We were able to isolate a number of acidophiles, and their 16S ribosomal DNA sequences indicated that they were related to members of the *Acidiphilium*, *Sulfobacillus*, *Thiomonas*, and *Metallibacterium*. Their growth characteristics are now being examined and will be presented.

acidophile, extremophile, ecology

発表責任者：友居　昌慶（tomoi.masayoshi.85c@st.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：4A03-09
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:00～ ミーティングルーム A

高濃度 CO_2 適応と窒素固定能を備えた微生物群集の解析

Community analysis of high CO_2-tolerant and N_2-fixing microflora

○飯田 遥貴、油井 信弘、藤井 克彦（工学院大先進工）
○Haruki IIDA, Nobuhiro ABURAI, Katsuhiko FUJII (Kogakuin Univ.)

現在の大気の CO_2 濃度は約 400ppm であるが、原始大気の CO_2 濃度は現在よりも高濃度であったと推測される。従って、当時生息していた微細藻類は高濃度 CO_2 に適応していたと考えられるが、現在でも高濃度 CO_2 下で生育する種が多数報告されている。他方では、水圏は一般的に貧栄養状態であり、低い窒素塩濃度により微細藻類の生育は律速されているが、貧栄養水域でもある程度の微細藻類の存在が確認されており、窒素固定能を持つ種が多く存在することが示唆されている。そこで本研究では、高濃度 CO_2 で生育でき、なおかつ窒素固定能をあわせ持った微細藻類を探索することを試みた。

河川清流で、岩や石の表面からバイオフィルムを回収し、微生物サンプルとした。窒素塩を含まない無機塩培地に微生物サンプルを接種し、10、20、40%の CO_2 存在下で培養したところ、継代培養を繰り返しても生育が継続的に観察されるサンプルを得た。限界希釈法でサンプル中の微細藻類を分離したが、藻類に加えて細菌や糸状菌も検出され、群集メンバー間で光合成と窒素固定を分担しながら生育していると示唆された。

While CO_2 concentration in modern atmosphere is around 400 ppm, that in primordial atmosphere is regarded as 30% or higher. Ancestor microalgae hence appear to acclimate to high concentration of CO_2. In contrast, natural aquatic environment is generally poor in nitrogen source, but microalgal growth is ubiquitously found there, suggesting that nitrogen-fixing phototrophs are dominant in non-polluted aquatic area. Although many reports for isolation of high-CO_2-tolerant or nitrogen-fixing algae were published, there is no report for a strain which possesses both abilities. We tried to isolate microalgae with both of high-CO_2-tolerant and nitrogen-fixing abilities. Environmental samples obtained from the mountain stream were inoculated in a mineral salts medium which lacks nitrogen sources and cultivated under 10-40% CO_2. After 1-month cultivation under 10% CO_2, microalgal growth were observed in two samples. Microalgal strains in the samples were isolated by the serial dilution method, but DGGE-PCR analysis showed that they are accompanied with bacteria and fungi, suggesting that photosynthesis and nitrogen fixation are allotted to phototrophic and heterotrophic members in the microalgal flora, respectively.

microalgae, DGGE, Community analysis

発表責任者：藤井克彦（st13631@ns.kogakuin.ac.jp）

講演番号：4A03-10
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:00～ ミーティングルーム A

乳酸菌におけるカフェインの影響について

Effect of caffeine against lactic acid bacteria

○齊藤 可剛[1]、佐藤 裕謙[2]、下御領 結衣[2]、水木 徹[3]、三浦 健[1,2,4] ([1]東洋大院・生命科学、[2]東洋大・生命科学、[3]東洋大・バイオナノエレクトロニクス研究センター、[4]東洋大・ ライフイノベーション研究所)
○Yoritaka SAITO[1], HIROAKI SATO[2], Yui SHIMOGORYO[2], Toru MIZUKI[3], Takeshi MIURA[1,2,4] ([1]Graduate School of Life Sciences, Toyo University, [2]Faculty of Life Sciences, Toyo University, [3]Bio-Nano Electronics Research Centre, Toyo University, [4]Institute of Life Innovation Studies, Toyo University)

【背景・目的】

カフェインはいくつかの植物に存在し、それを原材料とするコーヒーや茶といった食品などに含まれる。過去の知見において、カフェインには大腸菌などの病原菌に対して抗菌活性があることが示されている。一方で、乳酸菌などの有用な微生物に対しても、抗菌活性を有し、カフェインが含まれる食品の摂取により、腸内細菌叢のバランスが崩れる恐れが考えられる。そこで、カフェイン耐性を有する乳酸菌の単離を試みたところ、多くの乳酸菌がカフェイン存在下で生育不可能であるのに対し、2%存在下でも生育可能なカフェイン耐性乳酸菌の単離に成功した。本研究では、細胞膜の脂肪酸およびタンパク質に着目しカフェインによる影響を見出すことを目的とした。

【結果・考察】

1%カフェイン含有 MRS 液体培地で培養したカフェイン耐性乳酸菌を集菌し、Bligh & Dyer 法を用いて脂肪酸を抽出した。TLC を用いて脂肪酸を検出したところ、カフェイン有無によるスポットに明確な差異が見られた。またタンパク質の二次元電気泳動を行ったところカフェインの有無によりスポットに変化が見られた。それらスポットを MALDI-TOF/MS により解析したところ、カフェイン存在下において、代謝に関与する酵素などに変化が生じていることを見出せた。現在、カフェイン耐性乳酸菌のゲノム解析を行っている。

Currently, consumption of caffeine is increasing due to drinking coffee or addition caffeine to energy drinks. The effects of caffeine on human health have been studied well and antibacterial activity against pathogens such as *Escherichia coli*, *Streptococcus aureus* and others was reported. The further, probiotic bacteria in the intestine such as lactic acid bacteria (LAB) growth also is inhibited by caffeine.

In this present study, we demonstrated that caffeine resistance with 2 isolates of caffeine-resistant LAB. Lipids extracted from caffeine-resistant isolates cultured in the presence of caffeine were different compared to controls. In the extracted proteins also differed by the presence or absence of caffeine. Caffeine affected the expression of proteins involved in metabolism. In the future, we plan to do a genome analysis.

lactic acid bacteria, probiotics, caffeine

講演番号：4A03-11
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:00～ ミーティングルーム A

深部地下圏でメトキシ芳香族化合物分解を担う新規共生細菌の生存戦略
Strategy of a novel syntrophic bacterium degrading methoxylated aromatic compounds in deep subsurface

○坂本 幸子[1]、延 優　小西[2]、眞弓 大介[3]、玉澤 聡[2,4]、中原 望[2]、草田 裕之[2]、米林 英治[5]、岩間 弘樹[5]、五十嵐 雅之[5]、若山 樹[5]、前田 治男[3,5]、坂田 将[3]、田村 具博[2]、野村 暢彦[1]、鎌形 洋一[2]、玉木 秀幸[1,2] ([1]筑波大院・生命、[2]産総研・生物プロセス、[3]産総研・地圏資源、[4]幌延地圏環境研究所、[5]国際石油開発帝石株式会社)
○Sachiko Sakamoto[1], Masaru Konishi Nobu[2], Daisuke MAYUMI[3], Satoshi Tamazawa[2,4], Nozomi Nakahara[2], Hiroyuki Kusada[2], Hideharu Yonebayashi[5], Hiroki Iwama[5], Masayuki Ikarashi[5], Tatsuki Wakayama[5], Haruo Maeda[3,5], Susumu Sakata[3], Tomohiro Tamura[2], Nobuhiko Nomura[1], Yoichi Kamagata[2], Hideyuki Tamaki[1,2] ([1]Tsukuba Univ., [2]AIST,BPRI, [3]AIST,GRE,GSJ, [4]H-RISE, [5]INPEX)

近年、リグニン由来の物質であるメトキシ芳香族化合物（MAC）が、深部地下圏の生物学的メタン生成において重要な有機物である可能性が示されている (Mayumi et al.,2016,*Science*)。これまでに、MAC分解メタン生成経路はメタン生成菌、ホモ酢酸生成菌による経路が知られているが、一方で地下圏から分離されたMAC分解菌は1種のみで、その実態は不明である。最近、我々は地下圏から目レベルで新規の細菌を純粋分離することに成功し、さらにこの菌はメタン生成菌との共生系でMACを分解する共生細菌であった(Sakamoto et al.,2020,*Systematic and applied microbiology*)。そこで本研究では、この共生細菌株の代謝様式を決定し、新規共生系が地下圏においてどのような役割を担うかを検討した。ゲノム解析より分離株のMAC分解経路を検討したところ、MACからギ酸と水素を生成する経路が考えられ、実際にギ酸・水素資化性メタン生成菌との共生下でMAC分解及びメタン生成が確認された。また、エネルギー代謝を検討し、この反応におけるATP合成量を算出したところ、共生細菌の経路はメタン生成菌及びホモ酢酸生成菌よりも低いエネルギー量で反応が進むことが明らかとなった。これより、地下圏において実際にMAC分解反応でどれくらいのエネルギー量を獲得できるか評価する必要があると考えた。MACのような芳香族化合物を対象として、熱力学的解析を通じて微生物の代謝反応から獲得できるエネルギー量を評価した研究は少なく、特に地下圏のような高温高圧環境を想定した知見は限られている。本研究で熱力学的解析を行った結果、MAC濃度が低い条件 (<1 mM)では、メタン生成菌及びホモ酢酸生成菌は、MAC分解反応に必要なエネルギー量を獲得できず、共生細菌のみ反応が進むことが明らかとなった。地下圏では多様なMACが存在し得るがその濃度は低く維持されていると想定され、地下圏MAC分解メタン生成においては共生細菌がニッチを獲得している可能性が示唆された。

Coal bed methane and unextractable petroleum gain increasing attention as a next generation energy resource, yet the conversion of organic compounds associated with these resources to methane remains unclear. Methoxylated aromatic compounds (MACs) are lignin-derived and found across various ecosystems on earth, especially in coals and sedimentary organic matter in subsurface environments, and thereby those are likely a crucial organic source for subsurface methanogenesis. In this study, we elucidated metabolic capabilities of the novel syntrophic bacterium degrading MAC with a hydrogenotrophic methanogen based on genomics, and further revealed that the newly discovered syntrophic MAC degradation is thermodynamically more favorable than the known pathways in deep subsurface and may play a key role in the methane formation.

syntroph, subsurface, aromatic compound degradation
発表責任者：玉木秀幸（tamaki-hideyuki@aist.go.jp）

講演番号：4A03-12
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:00～ ミーティングルーム A

野生酵母 MC87-46 の糖資化能が清酒の味に及ぼす影響

The effect of the ability of *Saccharomyces cerevisiae* MC87-46 to assimilate isomaltose on sake taste

○堤 星太郎[1]、家田 明音[1]、三井 俊[2]、伊藤 彰敏[2]、志水 元亨[1]、加藤 雅士[1]([1]名城大院農、[2]あいち産業科学技術総合センター・食品工業技術センター)
○Seitaro TSUTSUMI[1], Akane IEDA[1], Shun MITSUI[2], Akitoshi ITO[2], Motoyuki SHIMIZU[1], Masashi KATO[1] ([1]Meijo Univ., [2]Food Research Centre, Aichi Centre for Industry and Science Technology)

近年、国内の清酒の消費量は減少しており、新たな特徴を付与した清酒の開発が求められている。我々は本学附属農場の花 (カーネーション) から野生酵母 MC87-46 を分離し、清酒の醸造に用いることで、従来の清酒とは異なる香味を持つ清酒『華名城 (はなのしろ) 』を開発した。本研究では、野生酵母 *Saccharomyces cerevisiae* (MC87-46) と一般的な清酒醸造用酵母である協会酵母 901 号 (K901) を用いて製造した清酒の成分を比較し、それぞれの酵母の糖資化能の違いが清酒の味に及ぼす影響を明らかにした。

野生酵母 MC87-46 を用いて清酒の小仕込み試験を行ない、醸造した清酒中の還元糖を還元糖分析用 HPLC を用いて解析した。K901 を用いた清酒に対して、MC87-46 を用いた清酒中には 25 倍のイソマルトースが含まれていた。そこで、*S. cerevisiae* の主要なイソマルターゼ (IMA1) のイソマルターゼ活性と *S. cerevisiae* のゲノム上に存在するイソマルターゼ遺伝子 (*ima1 - 5*) の転写量を解析した。K901 と MC87-46 由来の主要なイソマルターゼである IMA1 のリコンビナントタンパク質を調製し、イソマルターゼ活性を測定したところ K901 と MC87-46 間で有意な差は無かった。各イソマルターゼの転写量を qRT-PCR によって測定したところ、イソマルトース存在下で MC87-46 の *ima1 - 5* の転写量は K901 の約 250 分の 1 であった。これらの結果から、MC87-46 はイソマルターゼの転写が低くイソマルトース資化能が低いため、MC87-46 を用いて製造した清酒にはイソマルトースが多く含まれることが明らかになった[1)]。

Recently, wild strains of *Saccharomyces cerevisiae* isolated from a variety of natural resources have been used to make bread, beer, wine, and sake. In the current study, we isolated wild *S. cerevisiae* MC87-46 strain from the carnation (*Dianthus caryophyllus L*) flower and produced sake using the yeast. Then, we characterized the components, including ethanol, amino acids, organic acids, and sugars, in the fermented sake. Sake brewed with MC87-46 is sweet owing to the high content of isomaltose. The genomic DNA of MC87-46 encodes for isomaltases IMA1, IMA2, IMA3, IMA4 and IMA5. However, these genes were not induced in MC87-46 by isomaltose, and the strain did not possess isomaltase activity. These results show that MC87-46 cannot utilize isomaltose, resulting in its accumulation in the fermented sake. These findings suggest that MC87-46 is useful for commercial application in Japanese sake production because of its unique flavor and nutrient profile.

1) Tsutsumi, S, *et al* (2019), Sci Rep, **9**, 13908.

Saccharomycess cereviciae strain MC87-46, isomaltose, japanese sake

講演番号：4A03-13
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:00～ ミーティングルーム A

酵母によるフェノール臭物質産生機構

Mechanism of phenolic off-flavour substances production by yeast

○土信田 有紀、齊藤 美邑、尾形 智夫（前橋工科大生物工学科）
○Yuki DOSHIDA, Miyu SAITO, Tomoo OGATA (Maebashi Institute of Technology)

【目的】4-vinylgaiacol(4-VG)等の揮発性フェノール臭物質は、ビール、清酒、ワイン等では一般に異臭とされる。酵母 *Saccharomyces cerevisiae* では、4-VG 産生には *PAD1*、*FDC1* の両方の遺伝子が必須である。フラビンモノヌクレオチド(FMN)をプレニル化する酵素をコードしている大腸菌の *ubiX* 遺伝子と相同性があることより、*S. cerevisiae* の *PAD1* 遺伝子は、フラビンモノヌクレオチド（FMN）をプレニル化する酵素をコードしていると考えられる。*S. cerevisiae* の Pad1 タンパク質は、N 末端に 53 アミノ酸からなるミトコンドリア移行配列と想定される配列が存在している。一方、Fdc1 タンパク質は、前駆体であるフェルラ酸を脱炭酸し、4-VG に変換する酵素であり、細胞質に存在していると考えられる。本研究は、酵母の揮発性フェノール臭の産生機構を解明することで、酒類の品質向上に寄与することを目的としている。
【方法】4-VG 等の産生能は、液体培地にフェルラ酸 50μg/ml を添加し、産生した培地上精中の 4-VG 等を HPLC で測定した。
【結果】実験室酵母 *S. cerevisiae* BY4741 Δ*pad1* 株は、4-VG を産生しなかった。実験室酵母 *S. cerevisiae* BY4741 *Δpad1* 株に、大腸菌の *ubiX*（FMN プレニル化酵素）遺伝子を導入したところ、4-VG 産生能を回復した。*S. cerevisiae* の *PAD1* 遺伝子のアミノ酸移行配列を除去した *tPAD1* 遺伝子を *S. cerevisiae* BY4741 *pad1* 株に導入したところ、4-VG 産生能を回復した。以上のことより、*S. cerevisiae* では、プレニル化 FMN を補酵素として、Pad1 タンパク質が細胞質でフェルラ酸から 4-VG へ変換していると考察している。一方、ビール、ワイン汚染酵母 *Dekkera* (*Brettanomyces*) *bruxellensis* の *PAD*(フェノール酸脱炭酸酵素)遺伝子を、*S. cerevisiae* BY4741 *Δpad1* 株に導入したところ、4-VG 産生能を回復した。以上のことより、*D. bruxellensis* Pad タンパク質は、プレニル化 FMN を必須としない脱炭酸酵素であると考察している。

Volatile phenolic compounds such as 4-vinylgaiacol (4-VG) are generally regarded as off-flavour in beer, sake, wine. In yeast *Saccharomyces cerevisiae*, both *PAD1* and *FDC1* genes are essential for 4-VG production. *PAD1* encode an enzyme that prenylates flavin mononucleotides (FMN). Pad1 protein is converted from ferulic acid to 4-VG in cytoplasm using prenylated FMN as a coenzyme.

phenolic off flavour, yeast, Mitochondria

発表責任者：尾形智夫（tomoo.ogata@maebashi-it.ac.jp）

講演番号：4A03-14
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:00～ ミーティングルーム A

実用酵母株の代謝フラックス解析による発酵能力と代謝熱の関連の解析

Comparative metabolic flux analysis of industrial yeast strains revealed the high fermentation performance accompanied the metabolic heat generation

谷田部 楓太、岡橋 伸幸、清家 泰介、○松田 史生 (阪大情報)
Futa Yatabe, Nobuyuki Okahashi, Taisuke Seike, ○Fumio Matsuda (Osaka Univ.)

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* には異なる代謝表現型を持つ実用株が多数存在する。実用酵母株の代謝表現型と発酵能などの他の表現型との関連は不明な点が多い。そこで本研究では、^{13}C 代謝フラックス解析法を用いて代謝フラックスレベルで出芽酵母実用株の表現型比較を行うことを目的とした。*S. cerevisiae* の 2 倍体株（実験室株: BY4947、ワイン株: QA23、パン株: RedStar、清酒酵母: Kyokai7）を[1-^{13}C]グルコース含有 SD 培地（50 ml, 30℃）で回分培養し、対数増殖期の菌体を回収した。培地中のグルコース、グリセロール、酢酸の濃度は HPLC で、エタノールの濃度は GC で分析した。得られた情報から比速度を算出することで細胞内外の物質収支を決定した。菌体のタンパク質由来アミノ酸の ^{13}C 標識割合を GC-MS で分析し、ソフトウェア mfapy で代謝フラックス分布を算出した。その結果、実用酵母株は実験室株に比べ、エタノール生合成経路と TCA 回路の代謝フラックス量が高く、エタノール収率はむしろ低下する傾向があった。代謝フラックス分布から代謝熱量を推定したところ、実用酵母株は実験室株に比べ 2－3 倍高い結果となった。実際、実用酵母株は低温条件下で高い生育を示した。これらの結果から、実用酵母株の代謝状態は素早いエタノール生産に加え、低温ストレス耐性にも寄与していると推測された。

There are many strains of *Saccharomyces cerevisiae* (budding yeast) for specific industrial purposes such as brewing and bread-making. However, relationships among the high fermentation performance, the metabolic states, and the other phenotypes of the industrial yeasts are still unclear. In this study, the ^{13}C-metabolic flux analysis (^{13}C-MFA) of four diploid yeast strains including laboratory (BY4947), sake (Kyokai 7), bread (RedStar), and wine (QA23) yeasts was conducted. The results revealed that, while the Crabtree effect phenotype was observed for all strains, the metabolic flux level in the glycolysis were elevated in RedStar and Kyokai 7. Furthermore, the increased flux level in the TCA cycle was commonly observed in the three industrial strains. Thus the specific CO2, ethanol production rates and the metabolic heat generation estimated from the metabolic flux distribution were 2-3 folds greater than that of laboratory strain. The elevation of metabolic heat was correlated with tolerance against low-temperature stress.

Saccharomyces cerevisiae, Metabolic heat, Metabolic flux analysis

発表責任者：松田史生（fmatsuda@ist.osaka-u.ac.jp）

講演番号：4A03-15
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:00～ ミーティングルーム A

ラボスケールとプラントスケールの清酒成分プロファイリング比較解析

Comparative analysis of sake metabolome on lab-scale and plant-scale sake making

○岩橋 佑真[1,2]、小松 夕子[1]、小林 拓嗣[1]、矢澤 彌[1]、岩下 和裕[1,2]([1]酒類総合研究所、[2]広島大院・統合生命)
○Yuma Iwahashi[1,2], Yuko Komatsu[1], Takuji Kobayashi[1], Hisashi Yazawa[1], Kazuhiro Iwashita[1,2]
([1]NRIB, [2]Grad. Sch. Integr. Life, Hiroshima Univ)

【目的】小仕込み試験で得られた清酒と大仕込みで得られた清酒では酒質に差がある事が経験的に知られている。このような差を明らかにし、小仕込み清酒から大仕込み清酒の品質を予測することが可能となれば、効率的な製品開発の実現が期待できる。本研究では、まずは、仕込みスケールの違いにより生じる酒質の差を清酒成分レベルで明らかにすることを目的とした。
【方法と結果】大仕込みを行い、その際に使用した蒸米と麹米を冷凍保存し小仕込み試験に使用した。小仕込み試験は総米 200 g の一段 、570 g の三段小仕込みをそれぞれ 3 年、2 年分実施した。大仕込みと小仕込みにより作製した清酒について、一般成分分析・有機酸分析・香気成分分析・醸造酒メタボライト分析法によるメタボローム分析を行った。一般成分分析の結果、大仕込み清酒に比べ、小仕込み清酒の方が酸度・アミノ酸度が高く、日本酒度は低いという傾向が見られた。また、メタボローム分析では 545 個の再現性の高いピークが得られ、これらについてクラスター分析を行ったところ、まず、酒母添麹の一段小仕込みが分岐し（クラスターA)、仲留麹の一段小仕込み清酒が分岐した（クラスターB)。三段小仕込み清酒と大仕込み清酒は近傍に位置した(クラスターC)。さらに、年度の違いはほぼ各クラスター内に収まり、年変動よりも仕込み方法の違いの影響の方が大きいことが明らかとなり、麹の影響も示唆された。現在、各クラスターの成分の差異について詳細に検討している。

【 Purpose 】It is useful to predict the quality of sake made on a plant-scale from the result of lab-scale for efficient product development. However, effects caused by sake making scale are still limited for the prediction. Therefore, the purpose of this study is to investigate sake components caused by different sake making scale.
【 Methods and Results 】We made sake on plant-scale and the steamed rice and *koji* rice were froze for lab-scale sake making. In order to compare the effects of sake making scale, lab-scale sake making was carried out by a total of 200 g (one-step) or 570 g (three-step) of rice for three or two years, respectively. As a result of general sake analysis, it was found that difference in acidity, amino acid content and sake meter value between the sake making on lab-scale and plant-scale. In addition, cluster analysis of the sake metabolome suggested that it could be divided into three clusters involved sake making scale and *koji* rice.

sake, metabolome, sake making scale

発表責任者：岩橋　佑真（m196959@hiroshima-u.ac.jp）

講演番号：4A03-16
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:00～ ミーティングルーム A

麹と植物由来の糖セラミドの腸内細菌代謝に与える影響の違いの解析

Difference of the effects of glycosylceramides from koji and plant on the metabolism of intestinal microbial flora

○戴 凰凰[1]、永留 真優[1]、満生 萌水[1]、田中 猛豪[1]、中山 二郎[2]、北垣 浩志[1]([1]佐賀大学、[2]九州大学)

○Huanghuang Dai[1], Mayu Nagadome[1], Moemi Mansho[1], Taketoshi Tanaka[1], Jiro Nakayama[2], Hiroshi Kitagaki[1] ([1]Saga Univ., [2]Kyushu Univ.)

麹に含まれる糖セラミドは酒粕、甘酒、濁り酒、発酵大麦エキス、味噌などの多くの伝統発酵食品に含まれ、米や大豆など植物のものとは異なる化学構造を持つとともに、*Blautia coccoides* の増加効果などの腸内細菌叢の改善効果や肝臓コレステロール低下効果[1)]があることが示されている。

しかし具体的にどのようなメカニズムでこれらの効果を発揮するのかについての知見はまだ得られていない。そこで *in vitro* の嫌気腸内細菌解析系で、麹由来糖セラミドの添加の有無で代謝を調べ PLS-DA 解析を行った。その結果、20 μg/ml 大豆由来糖セラミドと麹由来糖セラミド添加群で腸内細菌の代謝物質が分離し、糖様物質、パルミチン酸、アラニン、チロシン、乳酸などが分離に寄与する候補物質として推定された。これらのことから、麹由来糖セラミドは恐らくその独自の化学構造によって腸内細菌代謝に影響を与え、独自の健康機能性を発揮していることが考えられた。

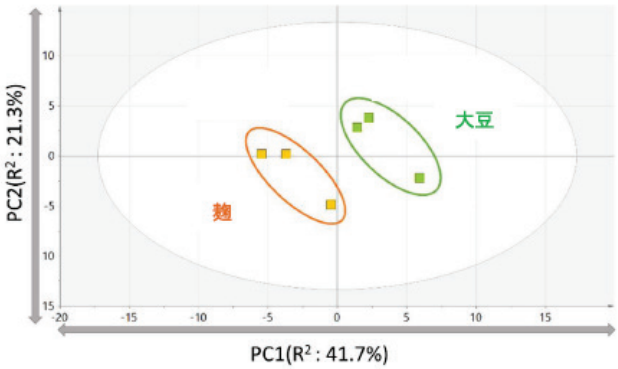


図　糖セラミド添加による腸内細菌代謝の変化

Glycosylceramide contained in koji, steamed rice fermented with *Aspergillus oryzae*, are contained in many Japanese fermented foods such as amazake, sake lees, fermeted barley extract and miso, has a characteristic molecular structure and exerts many health functions such as increase of *Blautia coccoides* and lowering activity of liver cholesterol in mice. However, its precise mechanism was not known. To elucidate its mechanism, we investigated the metabolism of intestinal microbial flora added with 20 μg/ml koji glycosylceramide or soy glucosylceramide using PLS-DA. As a result, these two samples were clustered distantly from each other. Substances such as sugar-like, palmitic acid, alanine, tyrosine and lactic acid were identified to discriminate between two clusters. It was considered that koji glycosylceramide exerts its specific function on intestinal microbes through its peculiar molecular structure.

1) *Biosci Biotechnol Biochem.* 2019 Aug;83(8):1514-1522.

koji, glycosylceramide, intestinal microbes

発表責任者：北垣浩志（ktgkhrs@cc.saga-u.ac.jp）

講演番号：4B02-01
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:30～ ミーティングルーム B

環境土壌における葉酸資化性菌の分布

Folate-utilizing bacteria in *Comamonas* family in soil environment

○土肥 裕希[1,2]、前田 典歩[1]、高谷 直樹[1,2] ([1]筑波大・生命環境、[2]筑波大・MiCS)
○Yuki Doi[1,2], Norifumi Maeda[1], Naoki Takaya[1,2] ([1]Univ. Tsukuba, [2]MiCS, Univ. Tsukuba)

【背景】葉酸（ビタミン B_9）はアミノ酸や核酸の生合成に必須な補因子である。葉酸の生合成・再利用経路は様々な生物で明らかにされているが、その生分解についてはほとんど解明されていない。本研究では環境細菌による葉酸代謝に着目し、それらの資化経路と細菌ドメインにおける資化能の分布を解析した。
【結果】葉酸資化性菌の網羅的単離とメタ 16S による菌叢解析は、圃場土壌に存在する主要な葉酸資化性菌が *Burkholderia* 目の *Comamonas* 科に属する細菌であることを示した。最も優位に存在した葉酸資化性菌 *Variovorax* sp.を対象にしたショットガンクローニング法によって、これらの葉酸資化の初発酵素として Glutamate carboxypeptidase（GCP）が見出された。アミノ酸配列の系統解析では、Proteobacteria 門の GCP は目レベルで多数のサブツリーを形成し、単離された葉酸資化性菌の GCP は全て *Burkholderia* 目細菌の GCP で形成されるサブツリーに属した。各サブツリーの組換え GCP を調製・検証した結果、*Burkholderia* 目細菌のサブツリーに属する GCP のみが葉酸と反応した。一方、*Burkholderia* 目細菌で高い葉酸資化能が認められたのは *Comamonas* 科の細菌のみであった。以上から、*Comamonas* 科の細菌が GCP 活性に依存した葉酸資化に優れていることが示された。

−***Background***− Folate (vitamin B_9) is an important cofactor to biosynthesize amino- and nucleic-acids. The folate biosynthesis and salvage pathway have been well-investigated whereas its biodegradation pathway is fairly understood. This study reports the bacterial folate utilization pathway and its distribution among bacteria groups.
−***Results***− Isolation and meta-analysis of 16S rRNA genes of folate-utilizing bacteria showed that *Comamonas* family bacteria in *Burkholderia* order were major folate-utilizing bacteria in fields. Shot-gun cloning of genes in *Variovorax* sp. FA-1, which was the most frequent isolated folate-utilizing bacteria, identified glutamate carboxypeptidase (GCP) catalyzed the first step for the folate-utilization. Phylogenetic analysis showed that GCP formed subtrees relevant to Proteobacterial evolution, and that GCPs of all the folate-utilizing isolates were located in the subtree comprised of GCP of *Burkholderia* order. Recombinant GCPs in the subtree of *Burkholderia* order used folate as a substrate while rGCPs in other subtrees did not. Bacteria classified into families in *Burkholderia* order other than *Comamonas* family could not utilize or a little utilize folate. These results indicated that the GCP-dependent folate-utilization mechanism is specifically distributed in the *Comamonas* family bacteria.

folate, vitamin, Comamonas

発表責任者：土肥　裕希（doi.yuki.ge@u.tsukuba.ac.jp）

講演番号：4B02-02
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:30～ ミーティングルーム B

植物病原菌 *Pseudomonas syringae* における Quorum Sensing 機構の多様性解析

Diversity of the genetic structure and function of quorum-sensing systems in the *Pseudomonas syringae* complex

○諸星 知広[1]、大嶋 旭昇[1]、謝 肖男[2]、染谷 信孝[3] ([1]宇大院地域創生、[2]宇大バイオ、[3]農研機構)
○Tomohiro Morohoshi[1], Akinori Ohshima[1], Xiaonan Xie[2], Nobutaka Someya[3] ([1]Grad. Sch. Reg. Devel. Creativity, Utsunomiya Univ., [2]Bio. Sci. Cent., Utsunomiya Univ., [3]NARO)

多くのグラム陰性植物病原菌は、Quorum Sensing シグナル物質としてアシル化ホモセリンラクトン（AHL）を生産する。*Pseudomonas syringae* complex に属するいくつかの株は、AHL 合成酵素 PsyI と AHL 受容体 PsyR からなる Quorum Sensing 機構を有している。本研究では、*P. syringae* complex に属する 630 株における PsyI/PsyR システムの多様性を調査した。

P. amygdali と *P. meliae* の大部分は AHL を生産し、*P. coronafaciens* と *P. syringae* の多くは AHL を生産しなかった。*P. amygdali* pv. *myricae*、*P. savastanoi*、*P. syringae* pv. *solidagae, maculicola, broussonetiae, tomato* は *psyI* 遺伝子を保有していたが、検出可能な AHL を生産しなかった。その理由として、*P. savastanoi* では、PsyI のアミノ酸置換（R27S）で AHL 生産を阻害され、*P. syringae* pv. *tomato* の *psyI* 遺伝子は、フレームシフト変異を引き起こしていた。また、*P. amygdali* pv. *myricae*、*P. syringae* pv. *solidagae, broussonetiae* の PsyI は AHL 生合成能が残存していたが、*psyI* の転写を制御する *psyR* がアミノ酸置換またはトランスポゾン変異のため機能しないことで、PsyI が発現せず AHL が生産されないことが明らかとなった。

Several gram-negative plant pathogens possess quorum-sensing systems and produce *N*-acyl-L-homoserine lactone (AHL) as a quorum-sensing signal molecule. It has been reported that some strains belonged to *Pseudomonas syringae* complex possesses quorum-sensing system, which consists of AHL synthase PsyI and AHL receptor PsyR. In this study, we investigated the diversity of PsyI/PsyR quorum-sensing system in 630 strains belonging to the Pseudomonas syringae complex.

AHL production was observed in most strains of *P. amygdali* and *P. meliae*, and few strains of *P. coronafaciens* and *P. syringae*. *P. amygdali* pv. *myricae*, *P. savastanoi*, and *P. syringae* pv. *solidagae*, *maculicola*, *broussonetiae*, and *tomato* encoded *psyI*, but did not produce detectable amounts of AHL. In *P. savastanoi*, an amino acid substitution (R27S) in PsyI caused defective AHL production. The *psyI* gene of *P. syringae* pv. *tomato* was converted to pseudogenes by frameshift mutations. *Escherichia coli* harboring *psyI* genes from *P. amygdali* pv. *myricae*, and *P. syringae* pv. *solidagae* and *broussonetiae* showed high-level AHL production. Forced expression of functional *psyR* restored AHL production in *P. amygdali* pv. *myricae* and *P. syringae* pv. *solidagae*.

quorum sensing, acylhomoserine lactone, *Pseudomonas syringae* complex

講演番号：4B02-03
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:30～ ミーティングルーム B

自家熱型高温好気消化液から植物成長促進・抗植物病原性を持つ有用微生物の分離と検証

Isolation and verification of valuable bacteria with plant growth promotion and anti-plant pathogen activities from ATAD fluid

○吉村 萌梨、SALMAN Alsayeda Zahra、近藤 宜希、井上 宙夢、田代 幸寛、酒井 謙二（九州大農）
○Moeri YOSHIMURA, Alsayeda Zahra SALMAN, Yoshiki KONDOU, Hiromu INOUE, Yukihiro TASHIRO, Kenji SAKAI (Kyushu Univ.)

近年、世界中で持続可能な社会への転換が求められており、有機系排水の再利用は資源循環に貢献する。現在、福岡県築上町では、屎尿・汚泥を自家熱型高温好気消化（Autothermal Thermophilic Aerobic Digestion : ATAD）法により処理し、病原菌フリーの高窒素含有液体肥料に変換し、農業に活用している。先行研究により、本プロセスの理化学特性および細菌群集構造を解明した（Tashiro et al., AEM 2018）。さらに、液体肥料に存在する細菌の機能を示し、有用細菌を分離することができれば、液体肥料の高付加価値が期待できる。そこで本発表では、築上町 ATAD 施設より採取した試料から細菌を分離し、植物成長促進（PGP）活性および抗植物病原活性を調査することを目的とした。

屎尿原液、消化 8 日後の ATAD 試料および液肥から合計 198 株の細菌を分離し、PGP 活性（窒素固定能、不溶態栄養素 (リン,カリウム,ケイ酸塩) の可溶化能、シデロフォア産生による鉄のキレート化能、オーキシンの前駆体であるインドール酢酸 (IAA) の産生能）およびイネ病原微生物に対する抗菌活性を調べた。その結果、PGP 活性を示す分離菌は 44 株見つかり、16S rRNA 遺伝子解析に基づき 16 種に同定された。さらに、104 株はイネ病原菌 3 種(*Pyricularia oryzae*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium fujikuroi*)に対して、抗菌活性を示した。以上の結果、ATAD により変換された液体肥料には、PGP 活性・抗イネ病原菌活性を有する細菌が存在することが明らかになった。現在は、PGP 活性を示した分離菌の効果を栽培試験で実証するとともに、他の植物病原菌に対する抗菌活性を調べる予定である。

Recently, The transformation to a sustainable society is being promoted all over the world, and the reutilization of organic wastewater would contribute to a recycle of resources. In Chikujo Town, Fukuoka Prefecture, human excreta have been converted into liquid fertilizer by the Autothermal Thermophilic Aerobic Digestion process (Tashiro et al., AEM 2018). This study aimed at isolating bacteria from ATAD samples, and at investigating plant growth promoting (PGP) activity and anti-activity toward rice-pathogenic microorganisms.

We isolated 198 bacterial strains from the samples collected from the ATAD facility in Chikujo Town, and PGP traits including nitrogen fixation, solubilization ability of insoluble nutrients, iron chelation ability by siderophore production, and indoleacetic acid production ability. As the results, 44 strains consisting of 16 species showed PGP traits. 104 strains showed anti-pathogenic activities toward 3 species (*Pyricularia oryzae*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium fujikuroi*). Cultivation test of Komatsuna will be performed to investigate actual PGP activity, and anti-activities towards other plant-pathogens will be also investigated.

plant growth promoting bacteria, anti-plant pathogenic activity, liquid fertilizer

講演番号：4B02-04
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:30～ ミーティングルーム B

Pseudomonas baetica SN4 株および細胞外多糖が植物にもたらす生理機能
Physiological functions of *Pseudomonas baetica* SN4 strain and extracellular polysaccharides on plants

○施 書琦[1]、西田 彩夏[1]、梶原 悠[2]、井藤 俊行[2]、渡邊 健吾[1]、須田 栞[1]、土肥 博史[1]、宮本 浩邦[1,3,4]、児玉 浩明[1] ([1]千葉大院・園芸、[2]京葉プラントエンジニアリング、[3]サーマス、[4]理研・IMS)
○SHUQI SHI[1], AYAKA NISHIDA[1], YU KAJIHARA[2], TOSHIYUKI ITO[2], KENGO WATANABE[1], SHIORI SUDA[1], HIROFUMI DOHI[1], HIROKUNI MIYAMOTO[1,3,4], HIROAKI KODAMA[1] ([1]Chiba Univ., [2]Keiyo Plant Engineering, [3]Sermas, [4]RIKEN IMS)

Pseudomona 属はグラム陰性好気性桿菌であり、菌体外多糖(EPS)の分泌によりバイオフィルムを形成することで生息場所を作り、環境ストレスから菌体を保護している。本研究では生育が良好なピーマンの茎から単離された *Pseudomonas baetica* の近縁株（SN4 strain)を用いて、培養条件による菌体外多糖の産生量、菌体および EPS が植物成長に与える影響、そして植物病害菌に対する抗菌活性について調べた。

SN4 株を 24 時間培養後､粘液状のバイオフィルムから多糖類を有機溶媒により沈殿として回収し、透析後、凍結乾燥により EPS 画分を得た。^{1}HNMR スペクトル解析により、EPS 画分には多糖類が含まれていることを確認した。タバコの地上新鮮重量と茎の長さにおいて EPS 濃度依存に成長促進効果が観察された。さらに SN4 株はブドウ炭疽菌、サツマイモ基腐病菌に抗菌活性を示した。これらの結果から SN4 株は植物成長促進バクテリアとして働くことが示唆された。

Pseudomonas is a gram-negative aerobic bacterium and forms a biofilm by secreting extracellular polysaccharides (EPS) that provides a habitat and alleviates environmental stress.

We isolated an SN4 strain of *Pseudomonas baetica* was from healthy bell pepper stems. Here we observed that SN4 strain showed antifungal activity against several plant fungal pathogens and the EPS enhance the growth of young tobacco seedlings.

Exopolysaccharide, *Pseudomonas baetica*, Plant Science

講演番号：4B02-05
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:30～ ミーティングルーム B

オオムギ根圏の共生微生物の単離と同定

Isolation and identification of barley root-symbiotic bacteria

○木代 勝元[1]、最相 大輔[1]、山下 純[1]、山地 直樹[1]、山本 敏央[1]、門田 有希[2]、持田 恵一[3]、中川 智行[4]、谷 明生[1]([1]岡大植物研、[2]岡大院環境生命、[3]理研 CSRS、[4]岐阜大応生)
○ Katsumoto KISHIRO[1], Daisuke SAISHO[1], Jun YAMASHITA[1], Naoki YAMAJI[1], Toshio YAMAMOTO[1], Yuki MONDEN[2], Keiichi MOCHIDA[3], Tomoyuki NAKAGAWA[4], Akio TANI[1] ([1]IPSR, Okayama Univ., [2]Grad. Sch. Environ. Llife Sci., Okayama Univ., [3]CSRS, RIKEN, [4]Fac. Appl. Biol. Sci. Gifu Univ.)

植物根圏には数多くの微生物が生息しており、植物の生育に関与している。当研究所ではイネ、オオムギの根圏微生物叢の通年でのアンプリコンシーケンス解析によるモニタリングを行っており、オオムギ根圏には *Janthinobacterium* と *Methylibium* 属細菌が優占していることがわかった。本研究では、これら微生物のオオムギ生長への影響を調べることを目的とした。オオムギの各部位から栄養培地及びメタノール単一炭素源の培地を用いて微生物を 107 株分離し、16S rRNA 遺伝子配列解析により 23 属 37 種の細菌を同定した。しかし *Janthinobacterium*、*Methylibium* 属細菌は単離されなかった。その代わり、*Rugamonas* 属細菌が多く分離され、それらの 16S rRNA 遺伝子配列はアンプリコンシーケンスで *Janthinobacterium* とアサインされているものと一致した。次に分離された *Rugamonas* 属細菌のうち 3 株のドラフトゲノムを得た。ゲノムの大きさは 7～7.5 Mbp、GC 含量は 63%前後、CDS 数は 6000 前後であった。デジタル DNA-DNA 交雑法、ANI 値、並びに *Rugamonas* 属細菌基準株との性質の比較の解析から、分離菌は新種であることが示唆された。今後、これらのオオムギ生長に対する影響について調査する。

Many microorganisms inhabiting the rhizosphere are affecting the growth of plants. In our institute, we are monitoring the yearly transition of the rhizospheric microbiota of rice and barley by amplicon sequencing. We found that the barley rhizosphere is dominated by *Janthinobacterium* and *Methylibium* species. We aimed to clarify the function of these microorganisms on barley growth. We isolated 107 strains from different tissues of the barley using a nutrient medium and a medium containing methanol as a sole carbon source. The isolates belong to 23 genera and 37 species as revealed by 16S rRNA gene sequencing. However, any isolates belong to *Janthinobacterium* and *Methylibium* species. Instead, many *Rugamonas* species were isolated, and their 16S rRNA gene sequences were identical with those assigned to *Janthinobacterium* in the amplicon sequence. Then we obtained the draft genomes of 3 *Rugamonas* isolates. Their genome size was 7 to 7.5 Mbp, the GC content was around 63%, and the CDS number was around 6000. Analysis of digital DNA-DNA hybridization, ANI values, and comparison of characteristics with the *Rugamonas* type strain suggested that the isolates belong a novel species. We will investigate the effects of these isolates on the barley growth.

barley, microbiome, rhizosphere

発表責任者：木代勝元（puf4638o@s.okayama-u.ac.jp）

講演番号：4B02-06
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:30～ ミーティングルーム B

バラから単離した酵母を用いたカプロン酸高生産株への育種

Breeding of a yeast from rose flower to improve Ethyl Caproate productivity.

○大谷 里菜[1]、松尾 啓史[2]、塩谷 瑞紀[1]、長谷川 哲哉[1]、古家 美紀[1]、清水 浩美[3]、大橋 正孝[3]、倉田 淳[1]、上垣 浩一[1] ([1]近畿大農、[2]近畿大院農、[3]奈良県産振セ)
○Rina OTAMI[1], Yosifumi MATUO[2], Mizuki SIOTANI[1], Tetuya HASEGAWA[1], Miki FURUIE[1], Hiromi SHIMIZU[3], Masataka OHASHI[3], Atusi KURATA[1], Koichi UEGAKI[1] ([1]Kindai Univ., [2]Grad.Sch.Kindai Univ., [3]NIID)

【目的】我々の研究室では近畿大学構内に咲く花から酵母を単離し、酒類製造に用いることを目標に酵母の育種・スクリーニングに取り組んでいる。本発表では単離酵母を育種し、清酒にフルーティーな香りを与える、リンゴ様の香りを呈するカプロン酸エチルを高生産する育種株を取得できたので報告する。

【方法】きょうかい酵母での研究からカプロン酸エチルを高生産する株は脂肪酸合成酵素(FAS2)の 1250 番目のグリシンがセリンに変化し、FAS の阻害剤であるセルレニンに耐性を持つことが報告されている。そこで EMS 処理により突然変異を誘発し、セルレニン耐性株を取得し、得られた株を用いて YPD20 を用いた醸造試験と実験室規模での清酒小仕込み試験と官能評価を行った。

【結果・考察】育種株のスクリーニングの結果、セルレニン耐性株が 12 個取得できた。YPD20 での醸造の結果、親株よりもカプロン酸エチルを高生産する株を 10 株取得することができた。この 10 株の中からきょうかい酵母 1801(K1801)よりもカプロン酸エチルを高生産する上位 3 株と K1801 と同等レベルのカプロン酸エチルを生産する 1 株を用いて清酒小仕込み試験を行った。結果、カプロン酸エチルを高生産する K1801 と同等レベルのカプロン酸エチルを生産する株が 1 株あることが分かった。一方、アルコール度数は K1801 よりも少なかった。官能評価の結果から、K1801 よりもアルコール感が弱いが香りがよく総合評価で高評価を得ることができた。

We have isolated yeast strains from flowers in the Kindai University campus and have been working on screening new strains and breeding them for use in sake production. In this presentation, we report the isolation of yeast strains that produce high levels of ethyl caproate, which gives an apple-like aroma to sake.

It has been reported that the cerulenin resistant kyokai yeast strains, which showed higher ethyl caproate production was the result of the G to Ser substitution at 1250 amino acid position in fatty acid synthase (FAS2). The cerulenin-resistant mutant was isolated as follows, the isolated strain isolated from rose was mutated by Ethylmethan sulfonate(4%,30min), and cerulenin-resistant strains(6ppm) were collected.

As the result, 12 cerulenin-resistant strains were obtained. These strains were cultured at YPD20 and analyzed by GC-MS. 10 strains that produce more ethyl caproate than the parent strain. Four of the ten mutants were subjected for small-scale kome koji brewing test. The result showed that one strain produced the same level of ethyl caproate as Kyokai 1801, which is known a high production of ethyl caproate. On the other hand, the alcohol content was lower than that of K1801. The results of sensory evaluation showed that the strain was less alcoholic than K1801.

Ethyl Caproate, breeding, cerulenin

発表責任者：上垣　浩一（k-uegaki@nara.kindai.ac.jp）

講演番号：4B02-07
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:30～ ミーティングルーム B

近畿大学構内の花から分離した酵母の遺伝的多様性解析

Genetic diversity analysis of yeasts isolated from flowers in the Kindai University

○松尾 啓史[1]、長谷川 哲哉[2]、笠行 康葉[2]、清水 浩美[3]、大橋 正孝[3]、都築 正男[3]、倉田 淳志[2]、上垣 浩一[2] ([1]近大院農、[2]近大農、[3]奈良県産振セ)
○ Yoshifumi MATSUO[1], Tetsuya HASEGAWA[2], Yasuha KASAYUKI[2], Hiromi SHIMIZU[3], Masataka OHASHI[3], Masao TSUDUKI[3], Atsushi KURATA[2], Koichi UEGAKI[2] ([1]Grad.Sch.Kindai Univ., [2]Kindai Univ., [3]Nara Pref. Inst. Indust. Dev.)

【目的】酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は様々な酒造りに利用されており、アルコール耐性や芳香産生能力などの特徴は酵母株ごとに異なっている。我々は、既存の醸造用酵母とは異なった新たな特色を持つ酵母を得ることを目標に、近畿大学構内の花々から酵母のスクリーニングを行っている。分離した分離酵母 40 株以上のマイクロサテライト解析を行い、系統樹を作成し遺伝的多様性を検討した。
【方法、結果】　近畿大学構内の花から分離した酵母からゲノム抽出を行い、12 遺伝子座のマイクロサテライトを含む領域をマルチプレックス PCR を行った。その後、得られた PCR 産物のフラグメントサイズから近隣結合法により分子系統樹を作製した。その結果、*AWA1*、YLRW delta20 遺伝子のサイズでは識別できなかった株を識別することができ、それぞれが異なる株であることが確認できた。また単離酵母はいくつかのクラスターを形成し、分離酵母独自のクラスターや清酒用酵母であるきょうかい酵母と同じクラスターに分離酵母が分布しているものも確認できた。

[Purpose] *Saccharomyces cerevisiae* is used in various sake brewing, and its characteristics such as alcohol tolerance and aroma production ability differ depending on the yeast strains. We have been screening yeasts from flowers in the Kindai University to obtain unique yeasts which possess different fermentation character from existing brewing yeast. We have successfully isolated over 40 strains, however, we could not distinguish the genetic difference of several strains using *AWA1* and YLRW20 PCR fragment size. So, we performed the microsatellite analysis toward the isolated yeast strains. A phylogenetic tree was created from the acquired genetic information, and genetic diversity was examined from its distribution.
[Methods and results] Genome was extracted from yeast isolates using Dr. GenTLE (from yeast)High Recovery(TAKARA), and multiplex PCR Plus Kit(QUIAGEN) was performed on regions containing microsatellite 12 loci. Then, the molecular phylogenetic tree was prepared from the fragment size of the PCR product using the neighbor-joining method. As a result, several strains that could not distinguished, as mention above, were confirmed that they were different. In addition, the isolated yeast formed several different clusters. Some strains belong to sake yeast, Kyokai yeasts

Saccharomyces cerevisiae, natural yeast, microsatellite

発表責任者：上垣浩一（k-uegaki@nara.kindai.ac.jp）

講演番号：4B02-08
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:30～ ミーティングルーム B

花酵母を元にした酢酸イソアミル高生産酵母の単離と分析

Analysis of Isoamyl Acetate High-Producing Yeast Based on Flower Yeast

○高木 敬信[1]、笠行 康葉[2]、古家 美紀[2]、大橋 正孝[3]、清水 浩美[3]、倉田 淳志[2]、上垣 浩一[2]([1]近大院農、[2]近大農、[3]奈良産業振興総合センター)
○ Hironobu TAKAGI[1], Yasuha KASAYUKI[2], Miki FURUIE[2], Masataka OHASHI[3], Hiromi SHIMIZU[3], Atsushi KURATA[2], Koichi UEGAKI[2] ([1]Grad. sch. Kindai Univ., [2]Kindai Univ., [3]Institute of Industrial Development)

日本酒の吟醸香の成分の一つである酢酸イソアミルは、ロイシン生合成経路にての副産物として生産されるが、本代謝経路はイソプロピルリンゴ酸シンターゼ（IPMS）が、L-ロイシンによるフィードバック阻害を受けることで、調節されている。したがって、IPMS のフィードバック阻害を解除あるいは弱めることで、副反応経路が優勢となり、酢酸イソアミルの前駆体であるイソアミルアルコール生産量が高まる。我々は大学構内から酵母をスクリーニング・育種を行い、オリジナル酒開発へ利用しようとしている。そこで、単離した酵母株 3 種類に対し、エチルメタンスルフォネート（EMS）及び 5’5’5-トリフルオロ-DL-ロイシン(TFL)を用いた育種定法に従い、アミノ酸分析、香気成分分析を行い、酢酸イソアミル高生産株の取得を試みた。その結果、親株に対 1.8～2.7 倍の酢酸イソアミル高生産株を 4 株得る事ができた。次に変異株の IPMS をコードする遺伝子 LEU4 のシークエンスを行い、変異個所の同定を行った。その結果、4 株中 3 株で従来知られている変異とは異なる変異が起こっていることが判った。本発表ではこれらの変異と細胞内ロイシン濃度、酢酸イソアミル生産との関係、ロイシンフィードバック阻害との関連を議論したい。

Isoamyl acetate, one of the components of the sake’s ginjo aroma, is a byproduct of the leucine biosynthetic pathway, and this pathway is regulated by feedback inhibition of L-leucine to isopropylmalate synthase (IPMS). Therefore, removing or weakening the feedback inhibition of IPMS can increase the production of isoamyl alcohol, the precursor of isoamyl acetate, because of side reaction pathway become dominant. We are screening and breeding yeast strains from Kindai university campus for use in the development of original sake. In this study, three isolated yeast strains were bred using ethylmethanesulfonate (EMS) and 5’5’5-trifluoro-DL-leucine (TFL). We obtained four strains that were 1.8 to 2.7-fold higher isoamyl acetate production than the parent strains. The mutant strains were sequenced of *LEU4*, which encodes for IPMS, and the mutation sites were identified. Three of the four strains exhibited mutations different from those previously known. We discuss the relation between these mutations and intracellular leucine amount, isoamyl acetate production, and leucine feedback inhibition.

Saccharomyces cerevisiae, 5'5'5-Trifluoro-DL-leucine, α-Isopropylmalate synthase

発表責任者：上垣浩一（k-uegaki@nara.kindai.ac.jp）

講演番号：4B02-09
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:30～ ミーティングルーム B

椿の枝から分離した野生酵母のビール醸造への利用を目指した特性分析

Characteristic analysis of *Saccharomyces cerevisiae* isolated from camellia branch for the application in beer brewing

○中村 日向子、関 淑楓、工藤 泰良、山本 歩（八戸工業高等専門学校）
○Hinako NAKAMURA, Yoshika SEKI, Taira KUDOU, Ayumi YAMAMOTO (National Institute of Technology, Hachinohe College)

現在、発酵食品業界では自然界から新規に分離した酵母を利用した新商品の開発が注目されている。所属研究室では、青森県東津軽郡平内町に位置するツバキ北限自生地帯として天然記念物に指定されている「椿山」のツバキの枝から新規に清酒酵母やワイン酵母と同種の *Saccharomyces cerevisiae* に属する出芽酵母の分離に成功し、「椿山酵母」として清酒やパンの開発を行ってきた。

このような背景のもと、本研究では、椿山酵母の新たな活用方法を見出すために、ビール醸造への利用の可能性に着目した。ビール市場が縮小傾向にある中で、多様性あるビールとして「クラフトビール」が大きな注目を集めており、地域活性化につながる産業の一つとして期待されている。

ビール醸造への適性を明らかにするため、麦汁におけるアルコール発酵試験および糖資化性試験を行った。麦汁に対するアルコール発酵試験の結果、ビール酵母と比較し発酵力が弱いものの、麦汁発酵力を有する酵母が複数確認された。また、マルトースに対する資化性を分析したところ、ビール酵母と比較しマルトースの資化に時間を要することが確認された。

In recent years, the development of new products using natural yeast isolated from nature is attracting interest in the fermented food industry such as bread and Japanese sake production. We isolated *Saccharomyces cerevisiae* from the camellia branch growing at Tsubakiyama in Hiranai city, which area has been designated a national monument in Japan. Isolated strains were named as Tsubakiyama yeast. While the beer market is shrinking, "Craft beer" is getting a lot of attention as a richly diverse beer. To produce a characteristic craft beer, in this study, we evaluate the beer brewing aptitude of Tsubakiyama yeast. The results of alcohol fermentation tests in wort showed that Tsubakiyama yeast fermented wort slowly than commercialized beer yeast strains. Tsubakiyama yeast showed the low activity of maltose assimilation compared with beer yeast.

wild type *Saccharomyces cerevisiae*, beer brewing, wort fermentation

発表責任者：中村日向子（r02ac05@hachinohe.kosen-ac.jp）

講演番号：4B02-10
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:30～ ミーティングルーム B

群馬 KAZE 酵母のカナバニン感受性が抑えられている要因についての調査

Investigation of the factor that repressed the sensitivity to canavanine in Gunma KAZE yeasts

○渡部 貴志[1]、栁澤 昌臣[1]、佐藤 勝也[2]、大野 豊[2]、田島 創[1]、吉野 功[1]([1]群技セ、[2]量研)
○ Takashi WATANABE[1], Masaomi YANAGISAWA[1], Katsuya SATOH[2], Yutaka OONO[2], So TAJIMA[1], Isao YOSHINO[1] ([1]Gunma Industrial Technology Center, [2]QST)

日本酒に含まれるカルバミン酸エチルの含有量を規制する国が今後増えてくることが懸念されており、全国的にその前駆物質である尿素を生産しない清酒酵母の開発が進められている。群馬 KAZE 酵母は、リンゴ様吟醸香のカプロン酸エチルを生産する株であり、1 号～4 号まで実用化されている。これまでに、KAZE2 号から尿素非生産性株を開発する際、カナバニンを含む CAO 培地での生育抑制がかかりにくいことが明らかとなった。この現象は、カナバニン硫酸塩を用いた時に顕著であった。そこで本研究では、他の群馬 KAZE 酵母や、カプロン酸エチル高生産性株の尿素非生産性化を促進するため、群馬 KAZE 酵母のカナバニン感受性が抑えられている要因を調査することを目的とした。まず、YD 培地で培養を行い、KAZE1 号～4 号および親株のきょうかい 901 号（K901）のアルギニン取り込み速度を調べた。増殖速度が株によって大きく異なっていたが、アルギニン取り込み速度に大きな違いはなかったことから、アルギニントランスポーターの *CAN1* やアルギナーゼ遺伝子 *CAR1* には変異していないと推測された。また、カプロン酸エチル高生産性株は、取得の過程で付与するセルレニン耐性により多剤耐性になりやすく、その対策に炭素源をグリセロールにすることが有効であることから、現在 CAO 培地の炭素源をグリセロールにして検討を進めている。

It is considered that the countries regulating volume of ethyl carbamate (EC) in Japanese sake would be increased. Because urea is a main precursor of EC, to reduce EC in Japanese sake, non-urea producing yeasts are being bred at each region of Japan. Gunma prefecture provides Gunma KAZE No. 1~4 yeasts as the ethyl-caproate producing strains. Previously, we found that the growth of KAZE yeasts in canavanine containing plate (CAO) could not well repress. In the present study, to promote breeding of non-urea producing yeasts with the highly ethyl-caproate productive background, we investigated the factors repressed the sensitivity to canavanine in KAZE yeasts. To investigate the arginine uptake rates in KAZE yeasts and wild strain K901, yeast strains were cultivated in YD medium. Although the growth rates were observed difference, arginine uptake rates were almost similar in each strain. Consequently, it was considered that arginine transporter gene *CAN1* and arginase gene *CAR1* of each strain were not mutated. The ethyl-caproate producing yeasts, obtained as cerulenin resistant strains, often became multi-drug resistant strains. Now, we are investigating the effect of carbon source in CAO medium.

ethyl carbamate, non-urea producing yeasts, canavanine

発表責任者：渡部貴志（watanabe-t@pref.gunma.lg.jp）

講演番号：4B02-11
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:30～ ミーティングルーム B

Insertion-Sequencing 解析により網羅的に同定されたビフィズス菌遺伝子の通常飼育マウス腸内における定着と生存への寄与の評価

Evaluation of the bifidobacterial genes for contribution to colonization and survival in the conventional mouse intestine as identified by Insertion-Sequencing

○井上 太貴、横田 篤、吹谷 智（北大院農）
○Taiki INOUE, Atsushi YOKOTA, Satoru FUKIYA (Hokkaido Univ.)

ビフィズス菌はヒトに多くの健康効果を与える腸内細菌であるが，ビフィズス菌の腸内での定着・生存機構には，未だ不明な点が多い．我々はこれまでに，ヒト由来ビフィズス菌 *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* 105-A 株（105-A 株）を用いて，トランスポゾン変異株集団を用いた Insertion-Sequencing 解析により，無菌マウス腸内での定着と生存に寄与するビフィズス菌遺伝子を網羅的に同定した．しかしながら，通常ヒトやマウスには腸内細菌叢が存在するため，これらの遺伝子が，腸内細菌叢を持つ通常飼育マウスにおいても定着と生存に重要であるかを評価する必要がある．そこで本研究では，網羅的に同定された遺伝子のうち，Tight adherence pilus ATPase (*tad*A), Cholate efflux transporter (*ctr*), Sortase (*srt*) の 3 遺伝子に着目して，通常飼育マウス腸内での定着における重要性を評価した．評価方法として，それぞれの遺伝子欠損株と，異なる薬剤耐性遺伝子を生育に影響のない領域に導入した比較株を作製してマウスへ等量投与し，糞便中におけるそれぞれの生菌数を経時的に計測することで検証した．その結果，Δ*tad*A 株においては比較株と比べ，腸内における生菌数が有意に上昇した一方で，Δ*ctr* 株と Δ*srt* 株においては比較株と比べて有意に減少した．この結果から，*ctr* と *srt* は腸内細菌叢存在下での腸内における定着と生存に重要な遺伝子であることが明らかになった．

Bifidobacteria are the intestinal bacteria that exert various health-promoting effects on humans, but there is much room for clarification of the mechanisms of intestinal colonization and survival. We previously identified bifidobacterial genes contributing to colonization and survival in germ-free mice by Insertion-Sequencing analysis using transposon mutant library of *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* 105-A (105-A). However, since humans and mice usually harbor the gut microbiota, evaluation of the contribution of those genes is required also in conventional mice. In this study, we focused on Tight adherence pilus ATPase (*tad*A), Cholate efflux transporter (*ctr*), and Sortase (*srt*), among the identified genes. First, gene deletion mutants and control strains were constructed using different drug resistance genes. Then, a mutant and control strain were administrated in equal doses to conventional mice, and the number of viable cells in feces was measured over time. As a result, the viable cells count in the intestine significantly increased in the Δ*tad*A compared with the control strain, while it significantly decreased in the Δ*ctr* and the Δ*srt*. From these results, it was clarified that *ctr* and *srt* are important genes for colonization and survival in the intestine in the presence of the gut microbiota.

Bifidobacteria, intestinal colonization, gene deletion

発表責任者：吹谷智（s-fukiya@chem.agr.hokudai.ac.jp）

講演番号：4B02-12
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:30～ ミーティングルーム B

遺伝子欠損株を用いた *Bifidobacterium longum* 105-A の逆流硫黄経路に関与する酵素遺伝子の同定

Identification of enzyme genes involved in reverse transsulfuration pathway in *Bifidobacterium longum* 105-A using gene-knockout mutants

○宮森 那知[1]、松本 菜々恵[1]、吹谷 智[1]、横田 篤[1]、和田 大[2] ([1]北大院農、[2]摂南大農)
○Nachi MIYAMORI[1], Nanae MATSUMOTO[1], Satoru FUKIYA[1], Atsushi YOKOTA[1], Masaru WADA[2] ([1]Hokkaido Univ., [2]Setsunan Univ.)

ビフィズス菌はヒト腸内に生息し，健康に有用な効果を示す．ビフィズス菌にその効果を十分に発揮させるためには，腸内での挙動に関わる栄養代謝学的な知見が重要であるが，アミノ酸代謝の知見は不十分である．

そこで我々は，ビフィズス菌のシステイン (Cys) / メチオニン (Met) 代謝の全容解明を目指して研究を進めてきた．これまでの研究から，*Bifidobacterium lomgum* subsp. *longum* 105-A（105-A 株）の Cys 要求性は Met で代替可能であり，Met から Cys へ代謝する逆流硫黄経路（➔）を有することが示唆された (Fig.) ．さらに，逆流硫黄経路の (II) のホモシステインから Cys への代謝経路について，CGL, CBS の機能を有する候補遺伝子の選抜を進めてきた．本研究では，候補遺伝子について遺伝子欠損株を構築し（ΔBL105A_0509 および ΔBL105A_0510），ビフィズス菌最少培地 (BMM) を用いた生育試験を行った．BMM+Cys 培地ではどちらの株も野生株と同様の生育が見られたが，BMM+Met 培地では両変異株ともに生育の低下が見られた．さらに，BMM+シスタチオニン培地では ΔBL105A_0509 は野生株と同様に生育したが，ΔBL105A_0510 は生育の低下が見られた．これらの結果から，BL105A_0509 と BL105A_0510 はそれぞれ CBS, CGL の機能を持つ遺伝子であると考えられた．

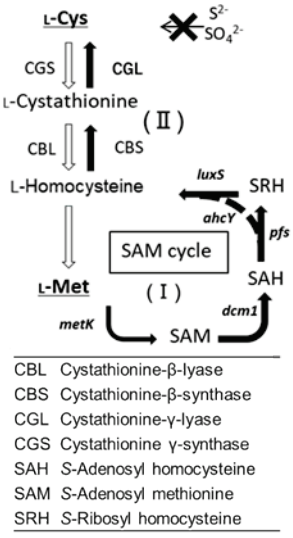


Fig. The estimated metabolism pathway of Cysteine / Methionine in 105-A .

Bifidobacteria exist in the human colon and are known to exert health beneficial effects. Because of the importance of understanding the nutrient metabolism of bifidobacteria, cysteine (Cys)/methionine (Met) metabolism has been investigated. Our previous study revealed that *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* 105-A (105-A) has a reverse transsulfuration pathway (➔) that metabolizes Met to Cys (Fig.). Furthermore, candidate genes have been selected to identify the genes harboring CGL or CBS functions in pathway II (Fig.).

In this study, knockout mutants of those genes were constructed (ΔBL105A_0509 and ΔBL105A_0510) , and tested their growth using Bifidobacterial minimal media (BMM). In the BMM+Cys, the growth of two mutants was similar to that of 105-A, but in the BMM+Met, growth of them was decreased. Also, in BMM+cystathionine, ΔBL105A_0509 grew as well as 105-A, but ΔBL105A_0510 showed reduced growth. From these results, it was considered that BL105A_0509 and BL105A_0510 have CBS and CGL function, respectively.

Bifidobacteria, cysteine and methionine metabolism, reverse transsulfuration pathway

発表責任者：和田　大（masaru.wada@setsunan.ac.jp）

講演番号：4B02-13
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:30～ ミーティングルーム B

環境中を伝播する新規 IncP-1 群様プラスミドの取得とその分布

Novel IncP-1-like plasmids transferring in the environment and their distribution

○金子 健成[1]、中道 孝一朗[1]、森内 良太[2]、道羅 英夫[2]、金原 和秀[1]、新谷 政己[1,2] ([1]静大院・総合科技、[2]静大・グリーン研)
○Kensei KANEKO[1], Koichiro Nakamichi[1], Ryota Moriuchi[2], Hideo Dora[2], Kazuhide Kimbara[1], Masaki Shintani[1,2] ([1]Grad. Sch., Shizuoka Univ., [2]Shizuoka Univ. RIGST)

異なる微生物間を接合伝達により移動可能なプラスミドは，宿主となる微生物に新たな形質を付与し，微生物の進化・適応を促進する一方で，多剤耐性菌の蔓延にも寄与しうる．我々は，環境中ではどのプラスミドがどの程度分布しているのかを知るために，全国各地の環境試料から，自己伝達能，または抗生物質耐性能を指標としてプラスミドを収集し，全塩基配列を解読してきた(一部を山本ら，日本農芸化学会 2020 年度大会にて発表)．その結果，最もよく研究された広宿主域プラスミド IncP-1 群と類縁であるが，既知のものとは分子系統的に異なる，新規性が高いプラスミドを，河川・湖沼・土壌・下水処理場の活性汚泥から計 7 本(#1~#7)取得した．これらの新規プラスミドのうち 3 本(#5~#7)は大腸菌への伝達が確認された．また，GC 含量は，既存の IncP-1 群プラスミドと比べても約 10%低く，限定された宿主に適応して進化したことが考えられた．さらに，新規プラスミドのうち 3 本(#3~#5)は，テトラサイクリンやマクロライド系，アミノグリコシド系抗生物質，スルホンアミドなどに対する耐性遺伝子を搭載していた．従って，これらのプラスミドは，これまで発見されてこなかったものの，環境中での耐性遺伝子の伝播に寄与している可能性が考えられた．現在，PCR-サザンブロットを用いて，これらの新規プラスミドの分布調査を進めている．併せて，これら新規プラスミドの接合伝達性試験や，他の IncP-1 群プラスミドとの不和合性試験も進めている．

Plasmids can transfer various genes between different bacteria and can provide beneficial traits to their host. Thus, plasmids can facilitate bacterial adaptation and evolution, whereas may contribute to spread of multidrug-resistant organisms. To investigate which plasmids are transferring and how they are distributed in the environments, we have captured plasmids from various environmental samples in Japan and have determined their complete sequences (Yamamoto *et al.*, JSBBA 2020). As a result, from environmental samples of river, lake, soil and activated-sludge from WWTPs, seven novel plasmids (#1~#7) were obtained, which were phylogenetically far-related from the previously-reported IncP-1 plasmids (well-studied, broad-host-range incompatibility group). Three (#5~#7) of these plasmids were found to be transferred into *Escherichia coli*. Also, G+C contents of these four plasmids are about 10% lower than the previously-reported IncP-1 plasmids, indicating that these plasmids have uniquely evolved with adapting to specific bacteria. Furthermore, three (#3~#5) of seven contained some resistance genes against tetracycline, macrolides, aminoglycosides and sulfonamides, and may have contributed to propagation of resistance gene in the environment. To investigate distribution of these unique plasmids in the environment, PCR-Southern blotting analyses are being conducted. In addition, mating assay and incompatibility test for these plasmids are under proceeding.

plasmid, IncP-1, antibiotic resistance

講演番号：4B02-14
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:30～ ミーティングルーム B

IncP-1 群プラスミドのα，βサブグループにおける接合伝達性の変化に関与する因子の探索

Investigation of factor(s) involved in differences in conjugation transfer in α and ß subgroups of IncP-1 plasmids

○岩田 和樹[1]、金原 和秀[1]、新谷 政己[1,2]([1]静大院・総合科技、[2]静大・グリーン研)
○Kazuki IWATA[1], Kazuhide KIMBARA[1], Masaki SHINTANI[1,2] ([1]Grad. Sch. Shizuoka Univ., [2]Shizuoka Univ. RIGST)

プラスミドは，急速な微生物の進化・適応に寄与する染色体外遺伝因子である．最もよく研究されているプラスミド群である広宿主域の IncP-1 群に属するプラスミドは，接合伝達によって様々な宿主に伝達し，その宿主内において安定に複製・維持することができる．しかし，我々の先行研究で取得した IncP-1β群プラスミド pMH0621-02-Tc は，*Escherichia coli*，または *Pseudomonas resinovorans* を供与菌とした際，*E. coli* には伝達するのに対し，*P. aeruginosa* には伝達しないという現象を見出した．そこで，IncP-1 群を代表する RP4（IncP-1α群）と，先行研究で得た他の IncP-1α，β群に属するいくつかのプラスミドについて，その接合伝達性を比較し，*P. aeruginosa* への接合伝達の可否にかかわる因子の解明を試みた．RP4 と pMNCN064（IncP-1α群），pMNCI060（IncP-1β群）について，*E. coli* から *P. aeruginosa* への接合伝達の可否を調べたところ，3 本のプラスミドのいずれも *P. aeruginosa* に接合伝達した．しかし pMNCI060 の伝達頻度は，pMNCN064，RP4 と比較すると，およそ 1/100 程度であった．現在，IncP-1β群プラスミドの *E. coli* から *P. aeruginosa* への接合伝達頻度が低かった原因を，各プラスミドの遺伝子配列の違いに基づいて探索している．

Plasmids are extrachromosomal genetic elements that contribute to rapid microbial evolution and adaptation. IncP-1 group plasmids containing the most well-studied plasmids, are able to be transferred to various kinds of bacteria by conjugation. However, pMH0621-02-Tc, a IncP-1β group plasmid, obtained in our previous study, was not able to be transferred to *P. aeruginosa* PA01 from *E. coli* or *P. resinovorans*, whereas it was transferred from them to *E. coli*. Comparisons of conjugation frequency of some IncP-1 group plasmids were performed including RP4, pMNCN064 (IncP-1α) and pMNCI060 (IncP-1β). These plasmids were able to be transferred to the PA01 from *E. coli*, however, the transfer frequency of pMNCI060 was lower than that of pMNCN064 and RP4 (around 1/100). The factor(s) causing low transfer frequency of IncP-1β plasmid from *E. coli* to PA01 are being investigated.

plasmid, IncP-1 group, conjugal transfer frequency

発表責任者：岩田和樹（iwata.kazuki.16@shizuoka.ac.jp）

講演番号：4B02-15
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:30～ ミーティングルーム B

IncP-1 群プラスミドにおける *trbO* 遺伝子の機能解析

Presence of *trbO* is important for conjugative transfer of IncP-1 plasmid.

○山田 亮[1]、金原 和秀[1]、新谷 政己[1,2] ([1]静大院総合科技、[2]静大・グリーン研)
○Ryo Yamada[1], Kazuhide Kimbara[1], Masaki Shintani[1,2] ([1]Grad. Sch. Shizuoka Univ., [2]Shizuoka Univ. RIGST)

プラスミドは，染色体とは物理的に別個に存在する自己複製遺伝因子であり，接合伝達によって様々な形質を異なる微生物に付与することができる．プラスミドの接合伝達機構の理解は，分子生物学研究において重要であるため，分子レベルの研究が詳細に行われてきた．最も良く研究されている不和合性群 IncP-1 群に属するプラスミドには，接合伝達に寄与する遺伝子が *tra* と *trb* オペロン上に存在し，その機能解析が進められてきたが，その全貌の解明には至っていない．我々は，様々な報告があるプラスミド pBP136（IncP-1 β）において，*trb* オペロンの最下流域に存在する *trb0* 遺伝子の有無により接合伝達頻度に変化が生じる現象を発見した．本研究では，これまで重要視されていなかった *trb0* の機能解明を目指し，その有無によるプラスミドの接合伝達頻度の違いを比較した．その結果，大腸菌を受容菌とした場合，遺伝子挿入による *trb0* 破壊によって 10^{-3} から 10^{-9} 以下への接合伝達頻度の低下が認められた．また，IncP-1 群には *trb0* をもたず，既存の IncP-1 群プラスミドと分子系統的に離れているプラスミドが存在し，その多くが腸内細菌から獲得されていることから，これらのプラスミドが *trb0* の脱落により腸内細菌に特化して進化した可能性を考え，*trb0* の役割や存在意義についても考察する．

Plasmid is an extrachromosomal self-replicating genetic element and can provide beneficial traits to different microorganisms by conjugation. Molecular level analyses of the conjugation mechanism have been conducted in detail. The most well-studied incompatibility group IncP-1 plasmids have genes involved in conjugation on the *tra* and *trb* operons, but functions of several genes are not elucidated yet. We found that the presence or absence of the *trbO* gene in the downstream region of the *trb* operon caused change in the conjugation frequency of pBP136 (IncP-1β). The objective of this study was to elucidate the function of *trbO*. The conjugation frequency was compared by the presence or absence of *trbO*. As a result, when *Escherichia coli* was used as a recipient, *trbO* disruption reduced the conjugation frequency from 10^{-3} to 10^{-9} or less. In addition, we found some other plasmids of IncP-1 group without *trbO* gene. Notably, they were phylogenetically far from the well-known IncP-1 group plasmids, and most of them were obtained from intestinal bacteria. These facts suggested that these plasmids might be adapted to intestinal bacteria by losing *trbO*.

plasmid, IncP-1, conjugational transfer gene

発表責任者：山田亮（yamada.ryo.16@shizuoka.ac.jp）

講演番号：4B04-01
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:30～ ミーティングルーム B

枯草菌宿主でのフラボノイドで誘導可能なハイブリッド型タンパク質高発現系の開発

Hybrid-type efficient protein-expression system inducible by flavonoids in *Bacillus subtilis*

藤田 紘人、萩原 利幸、○広岡 和丈（福山大生命工・生物工）
Hiroto FUJITA, Toshiyuki HGIHARA, ○Kazutake HIROOKA (Fukuyama Univ.)

【目的】安全性が認められている枯草菌を宿主として、植物由来低毒性物質であるフラボノイドを誘導物質とするタンパク質高発現系を構築し、評価を行なった。【方法・結果】枯草菌のケルセチン 2,3-ジオキシゲナーゼ（QdoI）の遺伝子を含む *qdoI-yxaH* オペロンのプロモーター（P*qdoI*）は、２つの転写因子（LmrA と QdoR）によって負に制御され、特定のフラボノイドで脱抑制される[1)]。また、*ylbP* 遺伝子の SD 配列が高効率であるという知見があり[2)]、加えてコアプロモーターの上流域（UP）を *rrnB* 遺伝子のものの改変型（UP_{NB}）に置換することで転写活性が向上することが報告されている[3)]。これらの情報をもとに、*qdoI* 上流制御領域の UP を UP_{NB} に、SD 配列を *ylbP* のものに置換し、さらにコアプロモーター活性の向上のために、LmrA と QdoR の結合配列に影響を及ぼさないように-35 と-10 配列を保存配列に変換したハイブリッド型発現誘導系（UP_{NB}-P*qdoIoylbP*）を構築した。これを EGFP 遺伝子と融合させて染色体中に導入した枯草菌株を作製し、フラボノイド添加・未添加の LB 培地で培養して蛍光強度を測定した。その結果、フィセチンまたはケルセチン添加によって明確な蛍光強度の誘導が確認され、フィセチンを用いた方が誘導効果が持続した。これは QdoI の基質特異性に起因すると考えられた。

In *Bacillus subtilis*, the *qdoI-yxaH* operon includes the gene encoding quercetin 2,3-dioxygenase (QdoI), and this operon's promoter (P*qdoI*) is repressed by two transcriptional factors (LmrA and QdoR) and derepressed by specific flavonoids[1)]. It is reported that the *ylbP* gene's SD sequence and the region upstream of the *rrnB* gene's promoter with modification (UP_{NB}) are highly efficient[2),3)]. The hybrid-type protein expression system comprising UP_{NB}, the modified P*qdoI* with the optimized core promoter, and the *ylbP*'s SD showed the distinct expression level inducible by the flavonoids such as quercetin and fisetin in *B. subtilis*.

1) Hirooka K, Fujita Y. Biosci Biotechnol Biochem. 2011;75:1325-1334.
2) Hirooka K, Tamano A. Biosci Biotechnol Biochem. 2018;82:1942-1954.
3) Zhou C, Ye B, Cheng S, et al. Microb Cell Fact. 2019;18:111.

Bacillus subtilis, flavonoid, protein expression

発表責任者：広岡和丈（hirooka@fukuyama-u.ac.jp）

講演番号：4B04-02
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:30～ ミーティングルーム B

糸状菌 *Aspergillus nidulans* が生産するペクチン酸リアーゼ AnPL9 の機能解析

Biochemical characterization of the pectate lyase AnPL9 from *Aspergillus nidulans*

○森島 俊輝、伊東 昂希、酒井 杏匠、志水 元亨、加藤 雅士 (名城大農)
○Toshiki MORISHIMA, Koki ITO, Kiyota SAKAI, Motoyuki SIMIZU, Masashi KATO (Meijo Univ.)

種々の多糖類を唯一の炭素源として、糸状菌 *Aspergillus nidulans* を培養し、生産された細胞外タンパク質を LC-MS/MS にてセクレトーム解析した。その結果、Polysaccharide Lyase family 9（PL9）に分類される AnPL9 はペクチンを含むいくつかの多糖応答的に発現した。糖質関連酵素データベース CAZY において、PL9 に分類される酵素は、主にペクチン分解酵素であり、ペクチン中のホモガラクツロナンを基質にする。しかし、これまでに PL9 に分類される酵素は細菌を中心として研究されており、真核生物が有する PL9 に属する酵素の機能は報告されていない。本研究では、真核生物の機能未知な PL9 に分類される AnPL9 の機能について解析した。AnPL9 をメタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* に異種発現させ精製後、種々の多糖と反応させた。その結果、AnPL9 はカルシウム依存的にペクチンの主成分であるポリガラクツロン酸、およびオリゴガラクツロン酸を基質にした。さらに、AnPL9 をテトラガラクツロン酸と反応させ、反応産物を MALDI-TOF/MS で分析したところ、不飽和ガラクツロン酸が生成された。このことから、 AnPL9 はペクチン酸リアーゼであることが明らかになった。現在、AnPL9 の酵素学的パラメータおよび基質特異性を検討している。

The enzymes classified into Polysaccharide Lyase family 9 (PL9) in carbohydrate-active enzymes database (CAZY) are mainly pectinolytic enzymes, which have been well studied in bacteria. However, the function of PL9 in eukaryotes has not been reported. Here, AnPL9 from a filamentous fungus *Aspergillus nidulans* was investigated.

A. nidulans was cultured using various polysaccharides as the sole carbon source, and the secretome analysis was performed. AnPL9 was expressed in response to several polysaccharides including pectin. Recombinant AnPL9 produced in *Pichia pastoris* was purified, and then reacted with various polysaccharides. The enzyme required calcium ion for its enzyme activity and showed the activity toward poly- and oligo-galacturonic acid. Furthermore, AnPL9 produced unsaturated galacturonic acid from tetragalacturonic acid. These indicate that AnPL9 is a pectate lyase. The experiments for substrate specificity and kinetic parameter of AnPL9 are now underway.

Aspergillus nidulans, AnPL9, Polysaccharide Lyase family 9

講演番号：4B04-03
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:30～ ミーティングルーム B

Aspergillus nidulans 由来新規ラムノガラクツロナンリアーゼの機能解析

Functional analysis of a novel rhamnogalacturonan lyase derived from *Aspergillus nidulans*

○伊東 昂希[1]、鈴木 裕満[1]、鈴木 健吾[1]、酒井 杏匠[1]、高須賀 太一[2]、堀 千明[3]、加藤 雅士[1]、志水 元亨[1] ([1]名城大農、[2]北大農、[3]北大工)
○ KOKI ITO[1], HIROMITSU SUZUKI[1], KENGO SUZUKI[1], KIYOTA SAKAI[1], TAICHI TAKASUKA[2], CHIAKI HORI[3], MASASHI KATOU[1], MOTOYUKI SHIMIZU[1] ([1]Meijo Univ., [2]Hokkaido Univ. agr, [3]Hokkaido Univ. eng)

Aspergillus nidulans を始めとする糸状菌は細胞外に様々な多糖分解酵素を分泌することが知られている。ペクチンのみを炭素源にして *A. nidulans* を培養後、セクレトーム解析したところ、機能既知のタンパク質とアミノ酸配列レベルで全く相同性がない機能未知タンパク質 (HP) が多数同定された。その中の一つ HP1 をペクチンの構成多糖と反応させたところ、ラムノガラクツロナン(RG)のみに作用した。HP1 による RG 分解産物を MALDI-TOF-MS にて解析したところ、不飽和結合を含む RG オリゴ糖が検出されたことから、HP1 は現存するいずれの Polysaccharide Lyase (PL) ファミリーにも属さない新規のラムノガラクツロナンリアーゼであることが判明し、AnRGL と命名した。X 線結晶構造解析から AnRGL はβ-helix 型の構造を有することが示された。さらに、野生株および AnRGL の遺伝子破壊株（ΔAnRGL 株）を RGI のみを炭素源にして 3 日間培養後、得られた細胞外画分と RG を反応させた。その結果、ΔAnRGL 株では RG オリゴ糖が検出されなかったことから、*A. nidulans* において AnRGL は、主要なエンド型のラムノガラクツロナン分解酵素であることが明らかになった。

Many filamentous fungi produce carbohydrate-active enzymes. *Aspergillus nidulans* grown with pectin as sole carbon source secreted many hypothetical proteins (HPs). Among them, we identified a novel Rhamnogalacturonan lyase (AnRGL) in *A. nidulans*, as follows. Blast analysis of the amino acid sequence of AnRGL using the NCBI protein database revealed that this enzyme had neither any similarity to any sequences nor any putative conserved domains. The activity of AnRGL was significant towards rhamnogalacturonan (RG), but undetectable towards polygalacturonic acid, α -1, 5-arabinan, arabinogalactan and β -1, 4 -galactan that are components of pectin. RG degradation products by AnRGL were analyzed by MALDI-TOF-MS, and then RG oligosaccharides containing unsaturated bonds were identified. These results indicate that AnRGL is a novel rhamnogalacturonan lyase that belongs to a new polysaccharide lyase (PL) family.

Aspergillus nidulans , Rhamnogalacturonan lyase, secretome analysis

発表責任者：加藤雅士（mkato@ccalumni.meijo-u.ac.jp）

講演番号：4B04-04
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:30～ ミーティングルーム B

鰹節カビ *Aspergillus* 属糸状菌が生産する脂質分解酵素の特性解析
Characterization of lipolytic enzymes from *Aspergillus* spp. isolated from katuobushi
小川 千晶[1]、上村 真理子[1]、木村 行宏[1]、横田 仁子[2]、土居 幹治[2]、○竹中 慎治[1]（[1]神戸大院農、[2]マルトモ（株））
Chiaki Ogawa[1], Mariko Uemura[1], Yukihiro Kimura[1], Satoko Yokota[2], Mikiharu Doi[2], ○Shinji Takenaka[1] ([1]Kobe Univ. Grad. Sch. of Agric., [2]Marutomo co.)

【目的】日本の伝統食品である鰹節には、大きく分けて荒節と枯節の 2 種類が存在する。原料のカツオをおろし、煮熟・焙乾ものが荒節であり、*Aspergillus* 属糸状菌（鰹節カビ）を使ってさらに荒節をかび付け発酵させたものが枯節である。我々は、これまでに、かび付け時期やサンプルの違いによる好乾性糸状菌の優占種やその変化について解析し、5 種の鰹節カビを見出すとともに[1)]、鰹節カビが分泌生産する種々の菌体外加水分解酵素について調べてきた[2)]。本研究では、見出したリパーゼやエステラーゼ類の分解特性を明らかにすることを目的とした。
【方法】菌叢解析の過程で選抜した 5 種の菌株を用い[1)]、既報の方法に従って[1)]、鰹節（荒節）粉にて固体培養し、粗酵素液の回収と分画を行った。酵素活性測定： *p*-nitrophenyl-acylate、2,3-dimercapto-1-propanol tributyrate、魚油および olive oil を用いた。また、cod liver oil を基質とした酵素反応を行い、遊離脂肪酸抽出・精製後、GC-MS 分析した。
【結果】5 種の菌株由来粗酵素液は、pNP C4 に対する活性が高く、特に *A. sydowii* 種の粗酵素液は pNP C4 に対する活性が極めて高かった。5 種の菌株由来脂質分解酵素群は、人工基質に対する活性には相違が見られるが、魚油の分解特性は類似していた。粗酵素液を DEAE-Toyopearl で分画すると、*p*-nitrophenyl acylate に対する活性のクロマトグラムには種間で相違が見られた。また、*A. sydowii* 種以外のサンプルには pNP C4 および pNP C16 に対する活性がほぼ同程度の画分が見られた。魚油には、EPA（C20:5）や DHA（C22:6）が豊富に含まれているが、遊離脂肪酸には C16:0、C16:1、C18:0、C18:1 といった飽和および一価不飽和脂肪酸が多く含まれていた。1）S. Takenaka S et al., Int. J. Food Microbiol., 327:108654 (2020). 2）2020 年度 日本農芸化学会本大会（福岡）

Our aim was to identify and characterize lipolytic enzymes secreted by the dominant species involved in hydrolyzing and reducing lipid content during the molding process. The profiles of their enzyme production and hydrolytic properties indicated that *A. sydowii* was different from other four spices. *A. sydowii* secreted probably one lipolytic enzyme that showed quite high activity towards *p*-nitrophenyl butyrate. The crude enzyme preparations from *Aspergillus* spp. grown on katsuobushi solid medium hydrolyzed fish oil and more saturated and unsaturated fatty acids (C16:0, C16:1, C18:0, and C18:1) were produced than major polyunsaturated fatty acids (C20:5 and C22:6) in the fish oil.

Aspergillus, Katsuobushi, lipolytic enzyme

発表責任者：竹中　慎治（stakenaka@people.kobe-u.ac.jp）

講演番号：4B04-05
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:30～ ミーティングルーム B

高グルタチオン生産出芽酵母株におけるトランスグルタミナーゼの生産

Production of transglutaminase in glutathione-producing recombinant Saccharomyces cerevisiae

○原 陽子、油井 美優、原 清敬（静岡県立大学食品栄養科学部）
○yoko HARA, miyuu YUI, kiyotaka HARA (University of Shizuoka)

トランスグルタミナーゼ（TG）は生物界に広く存在し、タンパク質中の Gln 残基のγ-カルボキシアミド基と、各種一級アミン（L-Lys のε-アミノ基等）のアシル基転移反応を触媒し、タンパク質分子間または分子内にε-(γ-Glutamyl) Lys 結合を形成してタンパク質を架橋する。

放線菌（*Streptoverticillium mobaraense*）が生産するトランスグルタミナーゼ（SmTG）は食品の物性の改良剤として幅広く用いられ、その架橋反応の有用性から、食品加工分野だけでなく医療分野など様々な分野において利用されている。SmTG はグルタチオン添加によって活性化されることが知られており、産業界においても酵母エキスとの併用利用が報告されている。本研究では、SmTG のさらなる有効利用を目指して、SmTG を出芽酵母株に異種発現させた。酵母菌体内で SmTG が機能的に発現していることを、細胞より抽出した素酵素液による架橋実験により明らかにした。さらに SmTG をグルタチオン高生産酵母株へ導入し、トランスグルタミナーゼ活性が酵母内のグルタチオンによって活性化していることを明らかにした。

Transglutaminase (TG) is an enzyme catalyzing cross-links between protein molecules. TG from *Streptoverticillium mobaraense* (*Sm*TG) is widely used in food, cosmetic, biomaterial, and medical industries. *Sm*TG is occasionally supplied as mixture with an activator peptide, glutathione. At the present, glutathione is industrially produced using *Saccharomyces cerevisiae* because of its high content of glutathione in cell. In this study, active *Sm*TG was produced together with glutathione in *S. cerevisiae*.

It was confirmed that *Sm*TG extracted from *S. cerevisiae* expressing *Sm*TG (*Sc*MTG) showed cross-linking activity when BSA and sodium caseinate were substrates. This cross-linking activity of *Sm*TG was enhanced proportional to added glutathione concentrations. Furthermore, *Sc*MTG was prepared by extracting *Sm*TG from an engineered *S. cerevisiae* whose glutathione synthetic pathway was enhanced. The *Sc*MTG solution showed higher activity than that expressed in the parental *S. cerevisiae* strain. This result indicates that high content of intracellular glutathione further enhanced *Sm*TG in *S. cerevisiae*.

Transglutaminase, Glutathione, Yeast

発表責任者：原　清敬（k-hara@u-shizuoka-ken.ac.jp）

講演番号：4B04-06
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:30～ ミーティングルーム B

スギヒラタケ由来レクチンに関する生化学的研究
Biochemical research on lectin from the mushroom, *Pleurocybella porrigens.*
○中村 瑠奈[1]、稲吉 里美[2]、手塚 裕紀[1]、崔 宰熏[2,3]、道羅 英夫[3]、笹浪 知宏[2]、平井 浩文[2,3]、河岸 洋和[2,3]、鈴木 智大[1] ([1]宇都宮大・バイオ、[2]静岡大・農、[3]静岡大・グリーン研)
○Luna NAKAMURA[1], Satomi INAYOSHI[2], Yuki TEZUKA[1], Jae-Hoon CHOI[2,3], Hideo DOHRA[3], Tomohiro SASANAMI[2], Hirofumi HIRAI[2,3], Hirokazu KAWAGISHI[2,3], Tomohiro SUZUKI[1] ([1]C-Bio, Utsunomiya Univ., [2]Dept. of Agr., Grad. Sch. of Integr. Sci. and Technol., Shizuoka Univ., [3]Res. Inst. of Green Sci. and Technol., Shizuoka Univ.)

スギヒラタケ（*Pleurocybella porrigens*）はハラタケ目キシメジ科スギヒラタケ属に属し、日本では広く食用とされてきたきのこである。2004 年、東北・北陸地方を中心に原因不明の急性脳症が発生し、59 名の患者のうち 55 名がスギヒラタケを摂取していたことから、スギヒラタケが急性脳症の原因であることが予想されたが、未だその発症機構は不明である。
我々はこれまでに*Pleurocybella porrigens* lectin（PPL）の単離、精製および完全長cDNA塩基配列情報の取得に成功している[1)]。さらに、担子菌ウスキイロカワタケを用いた異種発現系の構築を試み、recombinant PPL（rPPL）の精製に成功している[2)]。しかしながら本方法で得られた組換えタンパク質は微量であった。そこで、本研究ではrPPL の大量発現系構築を試みるため、コールドショック発現系用ベクターを用いた大腸菌におけるPPLの異種発現を行った。アフィニティークロマトグラフィーで精製後、SDS-PAGEおよびMALDI-TOF/MSで目的タンパク質の取得を確認し、諸性質決定を試みた。その結果、native PPLと同等の安定性・糖認識能を有するrPPLを収率9.3 mg/Lで得ることに成功した。

The mushroom, *Pleurocybella porrigens* had been consumed as a foodstuff for a long time in Japan, especially in the Hokuriku and the Tohoku regions until 2004. However, in that year, acute encephalopathy was caused by eating this mushroom. To date, we have succeeded in the isolation, purification, characterization and cloning of the full-length cDNA sequence of *P. porrigens* lectin (PPL)[1)]. Furthermore, we constructed a heterologous expression system using the basidiomycete *Phanerochaete sordida* YK-624, which resulted in the extracellular secretion of recombinant PPL (rPPL)[2)]. However, the yield was only 1 mg/L culture broth. Thus, we tried to construct a more efficient heterologous expression system of PPL in *E. coli* using the pCold I DNA vector and investigate the properties of obtained rPPL in this present study.
As a result, the yield of rPPL after purification was 9.3 mg/L culture broth. Biochemical properties such as hemagglutinating acitivity, thermal stability, and pH stability indicated that rPPL expressed using this expression system had the same characteristics as that of native PPL.

1) Suzuki T., et al. Biosci. *Biotechnol. Biochem.*, 73, 702-709 (2009)
2) Suzuki T., et al. *J. Microbiol. Methods*, 100, 70-76(2014)

toxic mushroom, lectin, *Pleurocybella porrigens*

発表責任者：鈴木智大（suzukit@cc.utsunomiya-u.ac.jp）

講演番号：4B04-07
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:30～ ミーティングルーム B

希少放線菌 *Actinoplanes missouriensis* における胞子成熟に関わる細胞壁分解酵素遺伝子 *asmA* の機能解析

Functional analysis of the cell wall lytic enzyme-encoding gene *asmA* that is involved in spore maturation in *Actinoplanes missouriensis*

○譚 鋳文[1]、手塚 武揚[1,2]、大西 康夫[1,2] ([1]東大院・農生科・応生工、[2]東大・微生物連携機構)
○Zhuwen TAN[1], Takeaki TEZUKA[1,2], Yasuo OHNISHI[1,2] ([1]Grad. Sch. of Agric. and Life Sci., Univ. of Tokyo, [2]CRIIM, Univ. of Tokyo)

【背景・目的】希少放線菌 *Actinoplanes missouriensis* は栄養豊富な環境下では菌糸を伸長させて増殖するが、栄養飢餓状態に陥ると内部に数百の胞子を含む胞子嚢を形成して休眠する。胞子嚢は水に浸されると開裂し、内部の胞子を放出する。胞子はべん毛による運動能を持ち、走化性により栄養豊富な環境に至ると運動を停止して発芽し、再び菌糸を伸張する。我々はこのような生活環の中でも特に胞子嚢内部での胞子の成熟過程に注目して研究を進めており、過去に、細胞壁分解酵素をコードする *gsmA* の破壊株では胞子嚢内部で胞子が十分に成熟せず連結されたままの胞子鎖が多数観察されることを発表している (1)。一方で、*gsmA* 破壊株においても胞子の成熟はある程度進行していたことから、本研究では胞子成熟に関わる細胞壁分解酵素遺伝子の更なる探索と機能解析を行った。【方法・結果】細胞壁分解酵素をコードすると予想される遺伝子のうち、胞子嚢形成期に転写が強く誘導される *asmA* (*AMIS_65730*) と *AMIS_7130* に着目した。それぞれの遺伝子の単独破壊株および *gsmA* との二重破壊株を作製し光学顕微鏡で観察したところ、胞子嚢はいずれも正常に開裂したものの、Δ*gsmA*Δ*asmA* 二重破壊株において胞子嚢から放出された胞子鎖の長さが Δ*gsmA* 株と比較してやや伸びていた。そこで単独の胞子数、及び胞子鎖を構成している胞子数を計数したところ、解析した胞子の総数に占める単独の胞子の割合は野生株で 96.4%、Δ*gsmA* 株で 49.7%、Δ*gsmA*Δ*asmA* 二重破壊株で 19.5%であった。このことから、AsmA は GsmA と協調的に機能して、胞子嚢内部で胞子が成熟する過程に関わることが明らかになった。(1) Mitsuyama et al. 2019. *J. Bacteriol.* **201**:e00519-19.

[Backgrounds & Purposes] The rare actinomycete *Actinoplanes missouriensis* forms sporangia that contain hundreds of spores. Sporangia release the spores when immersed in water. We previously reported that the deletion mutant of *gsmA* released not only free spores but also spore chains from sporangia (1). In this study, we investigated two putative cell wall lytic enzymes that might be involved in the spore maturation. [Methods & Results] We focused on genes whose transcriptional levels are significantly increased during sporangium formation. Among them, *asmA* (*AMIS_65730*) and *AMIS_7130* were deleted in this study. The Δ*gsmA*Δ*asmA* double mutant released spore chains that were longer than those of the Δ*gsmA* mutant. Quantitative analysis of spore chains showed that the ratio of single spores in the Δ*gsmA*Δ*asmA* double mutant was lower than that in the Δ*gsmA* mutant. This result indicates that AsmA is involved in the process of sporangiospore maturation in cooperation with GsmA.

rare actinomycete, spore maturation, cell wall lytic enzyme-encoding gene

講演番号：4B04-08
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:30～ ミーティングルーム B

日本各地から取得した自己伝達性 IncPromA 群プラスミドの特徴の解明

Characterization of specific features of self-transmissible IncPromA group plasmids

○山本 雪絵[1]、金子 健成[1]、中道 孝一朗[1]、早川 雅也[1]、森内 良太[2]、道羅 英夫[2]、金原 和秀[1]、新谷 政己[1,2] ([1]静大院・総合科技、[2]静大・グリーン研)
○Yukie YAMAMOTO[1], Kensei KANEKO[1], Koichiro NAKAMICHI[1], Masaya HAYAKAWA[1], Ryota MORIUCHI[2], Hideo DORA[2], Kazuhide KIMBARA[1], Masaki SHINTANI[1,2] ([1]Grad. Sch. Shizuoka Univ., [2]Shizuoka Univ. RIGST.)

プラスミドは, 異なる微生物間を水平伝播して微生物の急速な進化・適応を促す遺伝因子である. 我々は，これまで発見例の少なかった IncPromA 群プラスミドを，日本各地の種々の環境試料から数多く取得し，実際は，本群プラスミドが環境中に広く分布していることを示した （山本ら，日本農芸化学会 2020 年度大会）. 得られたうちの 40 本について全塩基配列を比較した結果，サイズ（38-45 kb）や遺伝子構成が極めて類似していた. また本群に固有の 24 の遺伝子を multilocus sequence analysis によって比較すると，新規サブグループ IncPromAβ-2 を含む，4 種のサブグループに分類できた. 興味深いことに，取得した全ての本群プラスミドには，複製，維持，接合伝達に寄与する遺伝子の他には，宿主に何らかの表現型をもたらす既知の遺伝子（accessory gene）が見出されなかった. この結果は，環境中では，accessory gene をもたないプラスミドが伝播している可能性と，プラスミドを取得する過程で accessory gene を脱落したプラスミドのみが残った可能性を示している. さらに，本群プラスミドに *gfp* 遺伝子を挿入すると，プラスミド自体の安定性が低くなることが示唆された. 現在，本群プラスミドの性質について理解するため，その安定性，接合伝達頻度，宿主域，およびプラスミドコピー数を明らかにし，サブグループ間で比較しているところである.

Plasmids are mobile genetic elements to spread various genes providing new phenotype(s) to their hosts. IncPromA group was a recently proposed group and there were only a few reports [PMID: 25628616]. Previously, 104 IncPromA group plasmids were obtained from various environmental samples in Japan by exogenous plasmid capturing [Yamamoto *et al*, JSBBA 2020 conference]. Of these, 40 complete nucleotide sequences were compared in detail. They showed very similar sizes (38-45 kb), and 24 genes were conserved in all plasmids. Multilocus sequence analyses of the 24 genes showed that they could be classified into four subgroups including a novel one, IncPromAβ-2. Notably, none of them possessed any previously known ‘accessory’ genes providing some phenotype(s) to their hosts. This was probably because (i) IncPromA group plasmids without any accessory genes could spread in natural environment or (ii) the plasmids lost their accessory genes during exogenous plasmid capturing. Notably, the plasmid with *gfp* gene showed lower stability in the host. Now the basic features of them, including host range, stability, and copy number are being analyzed and compared.

plasmid, IncPromA group, exogenous plasmid capturing

講演番号：4B04-09
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:30～ ミーティングルーム B

IncPromA 群に属するプラスミドの異なる温度条件下での挙動の比較

Comparisons of behaviors of plasmids belonging to the Incompatibility group IncPromA under different temperature

○千葉 怜碧[1]、徳田 真穂[1]、雪 真弘[2]、大熊 盛也[2]、金原 和秀[1]、新谷 政己[1,2,3] ([1]静大院・総合科技、[2]理研・BRC-JCM、[3]静大・グリーン研)
○Reimi CHIBA[1], Maho TOKUDA[1], Masahiro YUKI[2], Moriya OHKUMA[2], Kazuhide KIMBARA[1], Masaki SHINTANI[1,2,3] ([1]Grad. Sch. Shizuoka Univ., [2]BRC-JCM, RIKEN, [3]Shizuoka Univ. RIGST)

プラスミドは染色体外遺伝因子であり，異なる細菌間を水平伝播する．我々の先行研究で取得したプラスミド pSN1104-11，pSN0729-62 は，同じ不和合性群 IncPromA 群に属する．IncPromA 群プラスミドのほとんどは，抗生物質耐性遺伝子等のアクセサリー遺伝子を搭載しておらず，実環境中での役割やその動態は不明である．この 2 つのプラスミドのうち，pSN0729-62 をもつ大腸菌を 37°C で培養すると，プラスミドが脱落する現象を発見した. そこで本プラスミドの安定性を, 選択圧のない, 異なる温度条件下で比較したところ, 25°C, 30 °C では安定に維持されたが，37°C より高い温度では宿主から脱落した．次に本プラスミドの，温度の違いにより得られる接合完了体の種類の変化を調べるため，*Pseudomonas* 属細菌を供与菌とし，土壌由来の微生物群集を受容菌群として，接合時の温度を 25，30，37°C とした接合実験を行った．同時に供与菌と混合せずに微生物群集のみを各温度に静置し，その菌叢変化も追跡した．接合完了体は，GFP の蛍光を指標にセルソーターを用いて収集した．固体培地上に一細胞ずつソーティング後，培養して出現したコロニーと，チューブにソーティングした 15000 細胞について，16S rRNA 遺伝子配列の解読を行ったところ，得られた接合完了体の種類が温度によって変化した．また，*Rhodobiaceae* 科細菌，*Aeromonadaceae* 科細菌は，温度の違いによって菌叢に変化は認められなかったが，接合完了体は 25°C でのみ得られた．以上から，pSN0729-62 は温度の違いにより，安定性や宿主域が変化することが示唆された.

The plasmid is an extrachromosomal DNA element and is horizontally transmitted among different bacteria. In our previous study, plasmids pSN1104-11, pSN0729-62, which belong to the same incompatibility group, IncPromA, were found from different environmental samples. Our objective was to understand basic features of the IncPromA plasmids including their replication, maintenance, and conjugative transfer. pSN0729-62 was shown to be unstable in *Escherichia coli* at 37°C. Then, its stability was compared at different temperatures. The results showed that it was stable at 25°C and 30°C, but not at higher than 37°C in *E. coli*, suggesting the temperature sensitivity of the plasmid of stability. Next, filter mating assays at different temperatures were performed with microbial communities extracted from a soil sample. Transconjugants were obtained by using flowcytometry and cell sorter using GFP as a marker. The transconjugants belonging to *Rhodobiaceae* and *Aeromonadaceae* were obtained only at 25°C, although the composition of these families of bacteria were unchanged regardless of different temperatures. These results suggest that the stability and host range of pSN0729-62 could change by different temperatures.

plasmid, Incproma, temperature sensitive

講演番号：4B04-10
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:30～ ミーティングルーム B

Methylobacterium aquaticum 22A 株におけるメタノール走化性の分子メカニズムの解明

Molecular mechanism of methylotaxis in *Methylobacterium aquaticum* strain 22A

○菊池 志保[1]、藤谷 良子[1]、加藤 純一[2]、谷 明生[1] ([1]岡山大植物研、[2]広島大院)
○ Shiho Kikuchi[1], Yoshiko Fujitani[1], Junichi Kato[2], Akio Tani[1] ([1]IPSR Okayama Univ., [2]Grad.Sch.Integr.Sci.Life, Hiroshima univ.)

Methylobacterium 属細菌はメタノールを利用する植物共生細菌である。当研究室で分離された *M. aquaticum* 22A 株はメタノールに対して強い走化性（以下、メチロタキシス）を示す。22A 株ゲノムには 52 個の MCP センサータンパク質がコードされている。また、本属細菌はメタノール脱水素酵素(MDH)を二種類持ち、カルシウム依存の酵素 MxaF とランタノイド（Ln）依存の酵素 XoxF を持つ。私たちは 22A 株のメチロタキシスセンサー遺伝子を３つ(Mcp1,2,3)同定したが、これら MCP のリガンドやメタノール代謝との関係は不明であるため、メチロタキシスの分子機構を明らかにすることを目的とした。22A 株はメタノールだけでなくホルムアルデヒドにも走化性を示した。MCP 遺伝子欠失株及び MDH 遺伝子欠失株のフェノタイピング、RNA-Seq によるトランスクリプトーム、蛍光顕微鏡観察によるタンパク質の局在解析から、細胞質局在性の Mcp1 の主要な基質はホルムアルデヒドであり、細胞の極に局在する Mcp2 は Ln 存在下で誘導されて細胞膜に移行し、MDH によるメタノール酸化とリンクして酸素に応答するエアロタキシスレセプターであり、また細胞極局在性 Mcp3 は主にホルムアルデヒドではなくメタノールを感知していると考えられた。

Methylobacterium species are methylotrophic bacteria symbiotic with plants. *M. aquaticum* strain 22A isolated in our laboratory is strongly chemotactic to methanol (“methylotaxis”). A total of 52 MCPs genes (chemotaxis sensors) as well as two types of methanol dehydrogenase (MDH), a calcium-dependent MxaF and a lanthanide (Ln)-dependent XoxF are present in the strain 22A genome. We identified three methylotaxis sensors (Mcp1,2,3), but their ligands and connection to methanol metabolism was unknown. Strain 22A showed chemotaxis not only to methanol but also to formaldehyde. Using the mutants of MDHs and MCPs and through phenotyping of mutants, transcriptome analysis, fluorescent microscopic analysis, we revealed: (1) Mcp1 is cytosolic sensor recognizing formaldehyde. (2) Mcp2 is induced by Ln and its localization changes from cell pole to cell membrane. It is an aerotaxis sensor linked to methanol oxidation by MDH. (3) Mcp3 localizes at the cell pole and its ligand is methanol.

chemotaxis, Methylobacterium, methanol

講演番号：4B04-11
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:30～ ミーティングルーム B

Mycobacterium smegmatis 由来 PzaA の酵素学的特性と発現制御機構の解析
Enzymatic characterization and analysis of transcriptional regulation mechanism of PzaA from *Mycobacterium smegmatis*.

○栄山 新[1]、薩仁朝格吐[1]、老沼 研一[1,2]、金子 幸弘[1,2] ([1]大阪市大院医・細菌、[2]大阪市大院医・感染科学研セ)
○Arata Sakiyama[1], SARENCHAOGETU X[1], Ken-Ichi Oinuma[1,2], Yukihiro Kaneko[1,2] ([1]Osaka City Univ. Grad. Sch. Med., Dpt. Bacteriol, [2]Osaka City Univ., RCIDS)

我々は、微生物のヒドラジド代謝に関する研究の一環として、一部の抗酸菌が有するイソニアジド(INH)分解酵素の研究に取り組んでいる。前回、*Mycobacterium smegmatis* MC²155 が産生する INH 分解酵素の正体は、ニコチナミダーゼ／ピラジナミダーゼとして知られる PzaA であったことを報告した。今回、特に PzaA の酵素学的特性および酵素産生の制御機序の検討を行った。反応速度論的解析の結果、INH に対する V_{max}、K_m 値はそれぞれ 1.5 μmol min^{-1} mg^{-1}、1.2 mM と算出された。INH に構造が類似したニコチン酸ヒドラジド、イソニコチンアミド、ニコチンアミド、ピラジナミドを基質として解析を行ったところ、これらの化合物にはより高い効率で作用することが明らかとなった(V_{max} 値は 7.2 ~ 35.7 μmol min^{-1} mg^{-1}、K_m 値は 0.06 ~ 1.3 mM)。一方、これら化合物の PzaA 発現誘導性を検討したところ、INH の培地への添加は PzaA の酵素活性と mRNA レベルをそれぞれ最大で 65 倍、500 倍に上昇させたのに対し、その他のヒドラジド、アミドはほとんど、あるいは全く発現誘導性を示さなかった。これらの結果から、PzaA は、タンパク質レベルの特異性は低いが、特異的な発現誘導システムの存在により、生理的には専ら INH の分解を担っているものと推察した。

We have been studying isoniazid (INH)-degrading enzymes in mycobacteria as part of our project to understand bacterial metabolic pathways of hydrazide compounds. We have recently identified the INH-degrading enzyme in *Mycobacterium smegmatis* MC²155 as PzaA, an enzyme known as nicotinamidase/pyrazinamidase of unclear function. Here we performed enzymatic characterization and analysis of transcriptional regulation mechanism of PzaA. We show that the V_{max} and K_m values of the enzyme for INH were 1.5 μmol min^{-1} mg^{-1} and 1.2 mM, respectively. PzaA degraded nicotinic hydrazide, isonicotinamide, nicotinamide, and pyrazinamide more effectively than INH showing higher V_{max} (7.2-35.7 μmol min^{-1} mg^{-1}) and lower K_m (0.06-1.3 mM) values. However, when added in growth media none of these compounds served as effective inducer of PzaA production except INH, which showed 65-fold and 500-fold induction in enzymatic activity and mRNA levels, respectively. Although PzaA does not appear to be specific for INH, we nevertheless speculate that it functions only to degrade INH because it is regulated by such a specific induction system.

hydrazidase, mycobacteria, amidase

発表責任者：老沼　研一（oinuma.kenichi@med.osaka-cu.ac.jp）

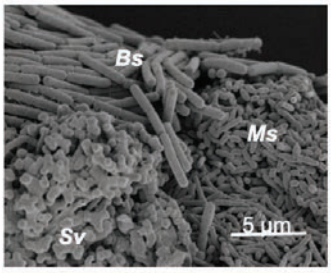
講演番号：4B04-12
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:30～ ミーティングルーム B

放線菌にコブ状形態を誘導するピロガロールの解析

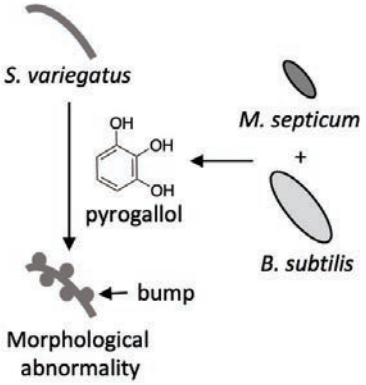
pyrogallol induced bump structure in *Streptomyces* cells

○加藤 愛美、浅水 俊平、尾仲 宏康（東大院農生科）
○Manami KATO, Shumpei ASAMIZU, Hiroyasu ONAKA (Univ. of Tokyo)

土壌から共分離された放線菌 *Streptomyces variegatus* HEK138A（*Sv*）とミコール酸含有細菌 *Mycobacterium septicum* HEK138M（*Ms*）の相互作用を解析している中で、枯草菌 *Bacillus subtilis* 168（*Bs*）を加えると偶然放線菌 *Sv* の菌糸にコブ状の形態が誘導されることを発見したことを、これまでに報告した。コブ状形態を誘導する物質を、活性を指標に三菌の共培養抽出物から探索したところ、活性物質が pyrogallol であることを明らかにした。本発表では、pyrogallol の放線菌への生物活性や、pyrogallol 生産者の同定について解析を行ったので報告する。Pyrogallol は固体培地において、放線菌に対し濃度依存的に、0.5～16 μg/ml ではコブ状形態誘導、32 μg/ml 以上では生育阻害作用を示した。Pyrogallol の生産菌を明らかにするために、共培養の条件を検討したところ、*Ms* と *Bs* の組み合わせのみから pyrogallol の生産が確認された。以上の結果より pyrogallol は二菌の相互作用によって生産され、放線菌にコブ形態を誘導することを明らかにした。本研究で明らかにした現象は、自然環境中において複雑な生態系を形成する細菌群のユニークな相互作用の一例を示していると考えられる。



三菌対峙面での*Sv*のコブ状形態の発見



During the analysis of interaction between *Streptomyces variegatus* HEK138A (*Sv*) and mycolic acid-containing bacteria *Mycobacterium septicum* HEK138M (*Ms*) which were co-isolated from the Hegura island soil, we incidentally found that the bump structures were formed in *Sv* mycelium by the mixed culture of three strains, Sv, *Ms*, and *Bacillus subtilis* 168 (*Bs*). The substance that induced the formation of bump structures in *Sv* was identified as pyrogallol in the co-culture extracts of three strains, using bioactivity-guided isolation. Pyrogallol induced the formation of bump structures on *Sv* from 0.5 to 16 μg/ml and inhibited the growth in more than 32 μg/ml. Interestingly, pyrogallol production was observed only in the combination of *Ms* and *Bs*. In summary, our results revealed that pyrogallol was produced by a bacterial interaction of *Ms* and *Bs*, and consequently induced the formation of bump structures in *Sv*. This phenomenon may be an exemplified interaction of complicated bacterial communities in the natural environment.

mycolic acid-containing bacteria, Bacillus subtilis, bacterial interaction

講演番号：4B04-13
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:30～ ミーティングルーム B

食用藍藻スピルリナが生産する細胞外高分子物質に関する研究

Analysis of extracellular polymer substance produced by cyanobacterium *Arthrospira platensis*

○坂巻 裕[1]、前田 海成[1]、兼崎 友[2]、大森 正之[3]、朝井 計[1]、渡辺 智[1]([1]東京農大院・バイオ、[2]静岡大学・グリーン研、[3]東京大学)
○Yutaka SAKAMAKI[1], Kaisei MAEDA[1], Yu KANESAKI[2], Masayuki OMORI[3], Kei ASAI[1], Satoru WATANABE[1] ([1]Tokyo University of Agriculture, [2]Shizuoka Univ., [3]Tokyo Univ.)

アフリカの塩湖であるチャド湖から単離された糸状性藍藻 *Arthrospira platensis*（通称、スピルリナ）は、健康食品や色素の材料として産業的に生産されている。また、硫酸多糖であるスピルランを含んだ細胞外高分子物質（Extracellular Polymeric Substances: EPS）を生産する。EPS は環境中では微生物の細胞を保護する役割を持つが、粘性、保水性を示すことから素材業界においても注目されている。我々はこれまでに、強光ストレスに曝されることによってスピルリナが EPS 形成を促進することを見出した。NIES コレクションから分与されたスピルリナを強光ストレス条件下で培養し、電子顕微鏡で観察した。通常培養時には単一菌種のように見られたが、強光ストレスを受けダメージを受けたスピルリナの表面に細菌が付着している様子が観察された。この培養液を pH10 の AONO 寒天培地に塗り広げ、好アルカリ性細菌を単離した。16S rRNA 遺伝子シーケンシングにより、アルカリ塩湖に生息する極限環境微生物 *Bacillus krulwichiae* であると同定した。さらに本株を全ゲノム解読し近縁種と比較した。本発表では同時に単離した *Bacillus pseudofirmus* と共にスピルリナとの関係性を議論していきたい。

The *Arthrosphira platensis* (commonly known as spirulina) isolated from Chad Lake in Africa has been used as a health food and pigment material. Since spirulina favors high-salt alkalophilic condition, it can be easily cultured in open system. Furthermore, spirulina produces extracellular polymeric substances (EPS) containing a sulfate polysaccharide called spirulan, which protect cells from environmental stress. EPS is attracting attention in the field of material science, because it shows high-viscosity and water retention. We have found that spirulina promotes EPS production under the continuous high-light stress condition. Electron microscopy of spirulina EPS revealed that bacteria adhere to the surface of spirulina cells. Since the spirulina culture becomes highly alkaline after high-light stress treatment, we spread the EPS culture to the alkalic agar medium and success to isolate the bacteria. 16S rRNA gene sequencing showed the bacterium as *Bacillus krulwichiae*, an extremophilic microorganism living in an alkaline salt lake. We have sequenced the complete genome of this strain and compared it with related species. In this presentation, we will discuss the relationship between this strain and spirulina with *Bacillus pseudofirmus* , which was newly isolated from spirulina EPS.

Cyanobacteria, Extracellular Polymeric Substances, *Bacillus*

講演番号：4B04-14
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:30～ ミーティングルーム B

腸管組織内共生細菌由来のシトクロム c による宿主樹状細胞のアポトーシス誘導機構

Cytochrome c released from intra-tissue opportunistic bacteria induce apoptosis of host dendritic cells

○柴田 納央子[1,2]、國澤 純[1,2,3,4,5]、安藤 正弘[1]、細川 正人[6]、堀井 俊平[7,8]、細見 晃司[3]、竹山 春子[1,6,7,8]、清野 宏[2,9,10] ([1]早大ナノライフ創新研、[2]東大国際粘膜ワクチン開発研究セ、[3]医薬健栄研ワクチン・アジュバント研究セ、[4]阪大院医学・薬学・歯学、[5]神戸大院医学、[6]早大先進生命動態研、[7]早大院先進理工、[8]産総研 CBBD-OIL、[9]UCSD 医学、[10]千葉大院医学)

○Naoko SHIBATA[1,2], Jun KUNISAWA[1,2,3,4,5], Masahiro ANDO[1], Masahito HOSOKAWA[6], Shunpei HORII[7,8], Kouji HOSOMI[3], Haruko TAKEYAMA[1,6,7,8], Hiroshi KIYONO[2,9,10] ([1]Res.Org.NanoLifeInnov.,WasedaUniv., [2]Int.Res.Dev.Cent.MucosalVac.,TokyoUniv., [3]Lab.Vac.Mat.,NIBIOHN., [4]Grad.Sch.Med.,Pharm.Sci.,Dent.,OsakaUniv., [5]Grad.Sch.Med.,KobeUniv., [6]Inst.Adv.Res.Biosyst.Dynam.,WasedaUniv., [7]Grad.Sch.Adv.Sci.Eng.,WasedaUniv., [8]CBBD-OIL,AIST,WasedaUniv., [9]Dep.Med.,UCSD., [10]Grad.Sch.Med.,ChibaUniv.)

我々の研究グループではこれまでに、腸管における主要な免疫誘導組織であるパイエル板の組織内に共生する細菌として、アルカリゲネス菌を同定してきた。アルカリゲネス菌は、パイエル板内において樹状細胞の内部に共生し、IgA 抗体の定常的な産生促進に寄与する一方で、共生関係の破綻により全身炎症を誘導することが明らかになっている。しかしながら、アルカリゲネス菌の共生関係がどのように維持されているのかは未解明であった。

本研究では、アルカリゲネス菌の過剰増殖に伴う形態変化と共に、真核生物におけるアポトーシス誘導因子であるシトクロム c の菌体内での増加と菌体外への放出が引き起こされ、その結果、樹状細胞のアポトーシスを誘導することを明らかにした。以上の解析結果は、アルカリゲネス菌の形態変化に伴うシトクロム c の蓄積と放出が、宿主細胞である樹状細胞との共生破綻因子となりうることを示唆している。

We previously identified *Alcaligenes* as a symbiont within dendritic cells (DCs) in the Peyer's patches. *Alcaligenes* contributes to IgA production via the appropriate activation of DCs and the impaired symbiosis induces inflammatory responses; however, it remains to be investigated how the symbiotic relationship is maintained. Here, we show that *Alcaligenes* changed the morphology from rod- to filament-shape, which was induced via quorum-sensing-dependent manner. The changes associated with the increase and release of cytochrome c, an apoptosis-inducing factor against eukaryotes, and consequently induced the apoptosis of host DCs. These findings indicated that the functional changes of *Alcaligenes* associated with their morphological change can be a regulator of symbiotic communication between *Alcaligenes* and DCs.

symbiotic bacteria, dendritic cells, apoptosis

講演番号：4B04-15
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:30～ ミーティングルーム B

ヒト腸内優占 *Bacteroides* 属細菌による動物宿主グリコサミノグリカン由来不飽和ウロン酸の代謝
Unsaturated uronate metabolism of animal host glycosaminoglycans by human enteric dominant bacteria *Bacteroides*

○高瀬 隆一、幸田 有希渚、渡辺 大輔、橋本 渉（京大院農）
○Ryuichi TAKASE, Yukina Kouda, Daisuke Watanabe, Wataru Hashimoto (Kyoto Univ.)

【目的】*Bacteroides* 属細菌はヒト腸内において優占性を示し、ヒト細胞外多糖であるグリコサミノグリカン（GAG）を資化する。GAG はヒトの非摂食時でも腸内に存在するため、GAG 資化能は本菌の腸内優占性を示す一因であると考えられる [(1)]。GAG はアミノ糖とウロン酸の二糖の繰り返し配列から構成される。これまで、常在菌 *Streptococcus* にいて、GAG 分解で生じる不飽和ウロン酸の代謝機構を明らかにしてきた。本研究では、*Bacteroides* 属細菌における不飽和ウロン酸代謝に関わる分子の同定を目指した。

【結果と考察】腸内優占菌である *Bacteroides ovatus* をグルコースと GAG [ヒアルロン酸 (HA) またはコンドロイチン硫酸 (CSC)] を単一炭素源とした培地で培養し、対数増殖期の細胞から全 RNA を抽出した。RNA-seq 解析に供したところ、グルコース資化時と比較して GAG 資化時に不飽和ウロン酸の代謝に関わると予想される一連の酵素（KduI、KduD、KdgK、KdgA）が全て約 10 倍以上遺伝子発現上昇を示し、GAG 代謝に関わることが示唆された（図 1）。

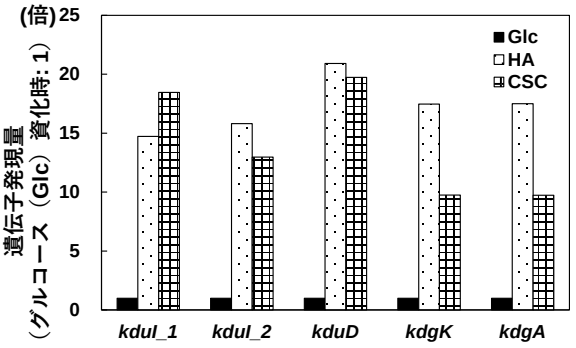


図 1. GAG 資化時の発現上昇

【Purpose】*Bacteroides* species are dominant bacteria in human gut and assimilate glycosaminoglycans (GAGs), extracellular polysaccharides secreted by human cells. GAG assimilation capability is considered to be a major factor for the dominancy of *Bacteroides* because GAGs constitutively exist in the gut regardless of host feeding [(1)]. GAG consists of repeating disaccharide unit, amino sugar and uronate. Although many proteins involved in the metabolism of amino sugars have been well studied, little is known about those of unsaturated uronate derived from GAG degradation. This study aimed to identify proteins essential for assimilation of unsaturated uronate.

【Results and Discussion】*Bacteroides ovatus* cells were grown in the presence of glucose or GAG [hyaluronate (HA) or chondroitin sulfate C (CSC)] as a sole carbon source and collected at the logarithmic growth phase followed by RNA-seq analyses. Four genes predicted to be involved in unsaturated uronate assimilation (KduI, KduD-homolog, KdgK, KdgA) were up-regulated by over 10-fold. This suggested that these enzymes are involved in assimilation of unsaturated uronate from GAGs.

[(1)]日本農芸化学会 2019 年度大会 一般講演トピックス集, p46-47 (2019)

Bacteroides, glycosaminoglycan metabolism, unsaturated uronate

発表責任者：橋本 渉（hashimoto.wataru.8c@kyoto-u.ac.jp）

講演番号：4B04-16
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:30～ ミーティングルーム B

Bifidobacterium bifidum のマウス経口投与による糞便中ムチン糖鎖の分解

Oral administration of *Bifidobacterium bifidum* leads to fecal mucin *O*-glycan degradation in mice

○加藤 紀彦、後藤 愛那、荒井 萌、片山 高嶺（京大院生命）
○Toshihiko KATOH, Aina GOTOH, Moe ARAI, Takane KATAYAMA (Kyoto Univ.)

【目的】ビフィズス菌の一種である *Bifidobacterium bifidum* は、ヒトの乳児から高齢者にまで幅広く共生しているのみならず、多くの有胎盤類の腸管にも生息している。この共生を成り立たせる要因の一つとして本菌のムチン分解・資化性が考えられる。*B. bifidum* は様々な特異的酵素を細胞表層に有し、*in vitro* でのムチン分解性については確かめられている。しかし、*in vivo* での実際の分解性について明らかではない。そこで今回、本菌の *in vivo* におけるムチン分解活性について検討した。
【方法と結果】C57BL/6 マウスに *B. bifidum* を経口投与（10^9 cell/日、5 日間）し、投与前後の糞便を回収した。糞便より抽出したムチン成分から β 脱離反応によって *O*-結合型糖鎖を遊離させ、固相抽出カラム等の精製後に完全メチル化および MALDI-TOF/MS 分析を行うことで糖鎖を解析した。また糞便ゲノム DNA の 16S rRNA 遺伝子を用いた菌叢解析によって *B. bifidum* 投与の菌叢への影響も評価した。その結果、顕著な菌叢変化は観察されなかったものの、より短い糖鎖の割合が高くなったことから、確かに *B. bifidum* は糞便中ムチンの糖鎖を分解すると推察された。

(Aim) A bifidobacterial species, *Bifidobacterium bifidum,* is a human-symbiont detectable in a broad age range from infants to the elderly and is also known to colonize various eutherian mammalian guts. We consider that its long-lasting symbiosis is partly due to the mucinolytic nature of the species. Indeed, *B. bifidum* has several mucin *O*-glycan-degrading enzymes anchored on the cell-surface. Although it has been shown that *B. bifidum* degrades mucin *in vitro,* its *in vivo* activity remains obscure. Therefore, we here examine whether it can degrade mucin *in vivo*.
(Methods and Results) C57BL/6 mice were administered with *B. bifidum* (10^9 cell per day for 5 days) by oral gavages. Mucin was extracted from fecal pellets and *O*-glycans were analyzed by using MALDI-TOF/MS after the purification and permethylation. Influence on the microbiota by *B. bifidum* administration was evaluated through sequencing fecal 16S rRNA genes. The results revealed that, though there was no obvious alteration in microbiota composition, *B. bifidum* administration increased the proportion of shorter length *O*-glycans, indicating the ability the organism to degrade mucin *O*-glycans in the colon.

Mucin, *Bifidobacterium bifidum*, *O*-glycan

発表責任者：加藤紀彦（tkatoh@lif.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：4C01-01
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:00～ ミーティングルーム C

枯草菌における Spo0A 依存的な membrane vesicle 生産

Spo0A-mediated biogenesis of membrane vesicles in *Bacillus subtilis*

○安部 公博[1]、豊福 雅典[1,2]、野村 暢彦[1,2]、尾花 望[2,3] ([1]筑波大生命環境、[2]筑波大微生物サステイナビリティ研究センター、[3]筑波大トランスボーダー 医学研究センター)
○Kimihiro ABE[1], Masanori TOYOFUKU[1,2], Nobuhiko NOMURA[1,2], Nozomu Obana[2,3] ([1]Fac. Life Environ. Sci., Univ. of Tsukuba, [2]MiCS, Univ. of Tsukuba, [3]TMRC, Univ. of Tsukuba)

Membrane vesicle (MV)は，直径 20~400 nm 程度の膜小胞であり，核酸/タンパク質/シグナル分子等の細胞間輸送を担うことで細菌の集団形成に重要な役割を果たす。しかしながら， MV の形成機構については，(特にグラム陽性細菌において)不明な点が多い。グラム陽性細菌の枯草菌は，Brain-Heart Infusion（BHI）培地中で MV を豊富に産生する。本研究は，枯草菌における MV 産生機構の解明を目的とした。これまでに，ウェルシュ菌(*Clostridium perfringens*)は，転写因子 Spo0A 依存的に MV を生産することが報告されている。そこで，枯草菌における MV 産生の Spo0A 依存性を検証したところ，*spo0A* 欠損株において，MV 量の著しい低下がみられた。また，定常期における遺伝子発現制御を担う転写因子 AbrB が，MV 産生を負に調節することがわかった。枯草菌において，Spo0A は AbrB の働きを抑制することが既に知られている。さらに，Spo0A/AbrB によって制御される多数の遺伝子のうち，sublancin 168 の生合成遺伝子が MV 産生に必要であることが見出された。Sublancin 168 は，抗菌活性を有する菌体外ペプチドであることから，sublancin 168 が枯草菌自身を攻撃し，ダメージを受けた一部の菌の細胞死/溶菌が MV 産生につながっている可能性が考えられた。

Bacteria release small membranous spherical structures called membrane vesicles (MVs). MVs contain and convey various biomolecules including nucleic acids, proteins, metabolites, and signal molecules, thereby participating in many biological processes. Yet, the molecular mechanism of formation of MVs still remains to be elucidated, in particular, in Gram-positive bacteria. To date, it is known that *Bacillus subtilis* produces abundant MVs in Brain-Heart Infusion (BHI) medium. In this study, we aim to clarify the mechanism of the MV production in *B. subtilis*. In a Gram-positive bacterium, *Clostridium perfringens*, MV production depends on Spo0A, which is the highly conserved master regulator of sporulation and biofilm formation in Gram-positive spore formers. We confirmed the involvement of Spo0A in the MV production in *B. subtilis*. Moreover, we show that a global transcriptional regulator AbrB, which acts downstream of Spo0A, negatively regulates the MV production. Out of a number of genes controlled by the Spo0A-AbrB regulatory cascade, we found that the biosynthesis genes for sublancin is required for the MV production. Because sublancin has a bactericidal activity, the MV production is inferred to be associated with sibling killing by sublancin and the consequent cell lysis.

Bacillus subtilis, membrane vesicle, antimicrobial

発表責任者：尾花望（obana.nozomu.gb@u.tsukuba.ac.jp）

講演番号：4C01-02
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:00～ ミーティングルーム C

Streptococcus mutans におけるクォラムセンシングを介した MV 産生メカニズムの解明
Quorum sensing induce MV production in *Streptococcus mutans*

○山本 千佳[1]、永沢 亮[1]、尾花 望[2,3]、野村 暢彦[3,4]、豊福 雅典[3,4]([1]筑波大院・生命環境、[2]筑波大・医学医療系・TMRC、[3]筑波大・MiCS、[4]筑波大・生命環境系)
○Chika YAMAMOTO[1], Ryo NAGASAWA[1], Nozomu OBANA[2,3], Nobuhiko NOMURA[3,4], Masanori TOYOFUKU[3,4] ([1]Grad. Sch. Life environ. Sci., Univ. Tsukuba, [2]TMRC, Fac. Medicine, Univ. Tsukuba, [3]MiCS, Univ. Tsukuba, [4]Fac. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)

多くの細菌はメンブレンベシクル(MV)と呼ばれる 20-400 nm 程の膜小胞を放出することが知られている。一部の MV は細胞死に伴って放出され、内部に核酸などが含まれていることが明らかになっている。また細菌はクォラムセンシング(QS)と呼ばれる細胞間コミュニケーションを行い、様々な遺伝子発現を調節している。*Streptococcus mutans* では QS によりオートリシン遺伝子が発現して細胞死が誘導されるため、*S. mutans* において QS を介して MV が産生されると予想し、QS と MV 産生の関係に着目した。本研究では *S. mutans* が QS により MV 産生が制御されているか、さらには、産生された MV の特徴や機能を明らかにすることを目的とした。本研究では *S. mutans* の WT において competence-stimulating peptide (CSP)、*comX*-inducing peptide (XIP)を用いて QS を誘導し、MV を定量した。MV 定量は蛍光膜染色にて行った。その結果 CSP、XIP どちらを添加した場合でも QS の誘導により MV 産生が増加した。さらに QS 関連遺伝子欠損株を用いて MV を定量したところ、自己溶菌に関与する遺伝子が MV 産生に関与していることが明らかとなった。また、MV の機能を理解するために MV による DNA の運搬に着目した。まずは MV に DNA が含まれるかについて調べたところ、ＭＶ内部に DNA が含まれることが明らかとなった。今後は、実際に自己溶菌が起こることで細胞内物質の放出がみられるかについて、ライブセルイメージングなどを用いながら明らかにし、MV に包括された DNA が形質転換にどのように関与しているのかについて調べていく。

Most bacteria release membrane vesicles (MVs) into the extracellular environment, which diameter range from 20 to 400 nm. We reported that cell wall damage accompanying cell death is a main route for MV production in Gram-positive bacteria. In *Streptococcus mutans* it has been reported that quorum sensing (QS) induces cell death by upregulating autolysin. Still, whether QS can induce MV production in this bacterium has not been investigated, and the role of MVs in QS of Gram-positive bacteria remains largely unexplored. In this study, we examined the involvement of QS in MV production of *S. mutans.*
S. mutans utilize two peptide signals called competence-stimulating peptide (CSP), and *comX*-inducing peptide (XIP). The results showed that, QS induce MV production in *S. mutans* UA159 by addition of CSP and XIP. We further examined this mechanism by using gene deletion mutants. MV production was not induced in a *lytF* mutant, suggesting that autolysin is involved in the MV induction by QS. Further studies are carried out to understand the role of MVs in competence in this bacterium.

Quorum sensing, Menbrane vesicle, Cell death

発表責任者：豊福　雅典（toyofuku.masanori.gf@u.tsukuba.ac.jp）

講演番号：4C01-03
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:00～ ミーティングルーム C

同属細菌間ゲノム比較とランダム変異解析による膜小胞過剰形成の機構解明

Analysis of hypervesiculation mechanism using genome comparison and random mutagenesis

○中道 菜緒[1]、森内 良太[2]、道羅 英夫[2]、二又 裕之[1,2]、田代 陽介[1,3] ([1]静大院総合科技、[2]静大グリーン研、[3]JST さきがけ)
○Nao NAKAMICHI[1], Ryota MORIUCHI[2], Hideo DOHRA[2], Hiroyuki FUTAMATA[1,2], Yosuke TASHIRO[1,3] ([1]Shizuoka Univ., [2]Shizuoka Univ. Green Science and Technology, [3]JST PRESTO)

膜小胞は微生物由来の細胞膜と同様の成分でできた細胞外小胞であり、微生物間相互作用の媒体として機能する他、ストレス応答や微生物生存戦略に重要な役割を果たしている。膜小胞形成は全ての原核生物で行われる普遍的現象であり、その形成に必須は遺伝子は存在しないことから、形成過程には多くの謎がいまだ潜んでいる。一方、細菌ゲノムは容易に取得可能な時代となり、そのゲノム情報から近縁細菌の膜小胞形成量を予測できれば、膜小胞研究の進展が期待される。これまでに当研究室では *Buttiauxella agrestis* DSM 4586^T が膜小胞を過剰形成することを見出している。本研究では、当細菌と近縁種 7 株のゲノムを比較することにより、膜小胞過剰形成の要因究明を目指した。当属細菌 8 株の膜小胞形成量を比較したところ、DSM 4586^T と同種の *B. agrestis* DSM 9389 でのみ膜小胞形成量が著しく低かった。DSM 4586^T 株のランダム遺伝子破壊株解析により膜小胞形成に影響を及ぼす因子を解析したところ、リポ多糖 (LPS) 合成遺伝子破壊株で膜小胞形成量が向上し、機能未知遺伝子 *omvA* 破壊株で低下した。*Buttiauxella* 属細菌 8 株の全ゲノム比較の結果、DSM 4586^T 株と形成量の少ない DSM 9389 株でのみ当 LPS 合成遺伝子群が保存されており、LPS の存在が膜小胞量形成抑制に働くことが見出された。一方、OmvA は DSM 4586^T 株のみに存在しており、膜小胞形成を促進する重要な因子であることが示唆された。

Membrane vesicles (MVs) are extracellular vesicles composed of cellular membranes derived from microorganisms. MVs play roles of microbial interaction and stress response, thereby they . The mechanism of MV formation varies according to the bacterial species and growing conditions, thereby the whole picture is not clear. *Buttiauxella agrestis* DSM 4586^T is a gram-negative bacterium that hyperproduces MVs. We compared *B. agrestis* with seven related strains and aimed to elucidate the mechanism of MV formation in this family. We found that MV production is increased by the deletion of the lipopolysaccharide (LPS) synthetic gene and decreased by un uncharacterized gene *omvA* in DSM 4586^T strain. *Buttiauxella* spp., The LPS synthetic gene cluster was conserved in *B. agrestis*, but not in other *Buttiauxella* species. In addition, only DSM 4586^T strain has *omvA* gene, suggesting that OmvA is a promoting factor for MV formation in a strain, in which LPS synthetic gene cluster is conserved.

membrane vesicle, genome, transposon

発表責任者：田代陽介（tashiro.yosuke@shizuoka.ac.jp）

講演番号：4C01-04
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:00～ ミーティングルーム C

Penicillium chrysogenum の細胞外膜小胞における抗菌活性の検討
Antibiotic activity in extracellular menbrane vesicle produced by *Penicillium chrysogenum*
○三上 力輝[1,2]、岩橋 由佳[3]、二宮 章洋[2]、古屋 俊樹[1]、浦山 俊一[2,4]、萩原 大祐[2,4]（[1]東京理科大・理工、[2]筑波大・生命環境、[3]筑波大・生命地球、[4]筑波大・MiCS）
○ RIKI MIKAMI[1,2], YUKA IWAHASHI[3], AKIHIRO NINOMIYA[2], TOSHIKI FURUYA[1], SHUNICHI URAYAMA[2,4], DAISUKE HAGIWARA[2,4] ([1]Fac. of Sci. and.Tech.,Tokyo Univ. of Sci., [2]Fac. of Life and Env., Univ. of Tsukuba, [3]Grad. Sch. of Life and Env., Univ. of Tsukuba, [4]MiCS, Univ. of Tsukuba)

細胞から放出される脂質二重膜で形成された小胞は、細胞外膜小胞(eMV; extracellular Membrane Vesicle)と呼ばれ、細胞外への物質輸送を担うと考えられている。細菌などで解析は進んでいるが、糸状菌における eMV の機能はほとんど明らかにされていない。一方、糸状菌は酵素や二次代謝化合物などの物質産生に優れた菌群であるが、その分泌機構については不明な点が多い。そこで本研究では、二次代謝産物の分泌に eMV が関与しているか検討する。

はじめに、複数の *Penicillium chrysogenum* ペニシリン高生産株を対象に、ペニシリン生産培地を用いて培養し、eMV の産生の有無を検討した。培養後期において小胞構造を維持した eMV を著量産生することがわかり、これらを超遠心により分離回収した。続いて、滅菌水で懸濁した eMV 試料をペーパーディスク試験に供したところ、一部の菌株の eMV で *Bacillus subtilis* に対する明確な抗菌活性が認められた。興味深いことに、この抗菌活性がペニシリナーゼ添加によって失われないことから、ペニシリンとは別の抗菌活性を示す物質が含まれると考えられる。現在、eMV に含まれる活性物質の分析を進めており、糸状菌の eMV が能動的な物質分泌機構として機能しているのか検証する。

Extracellular membrane vesicles (eMVs) are small, membrane-enclosed structures released from a cell into the surrounding environment. Although bacterial eMVs have been intensively studied, fungal eMVs are poorly understood so far. Filamentous fungi are able to produce plenty of extracellular enzymes and secondary metabolites. However, the secretion systems are only partly analyzed. In this study, we investigate if fungal eMVs are involved in secretion of secondary metabolites.

First, we searched for the condition under which multiple strains of penicillin-producing *Penicillium chrysogenum* were able to produce eMVs in the culture supernatant. After 16d-culture, the strains produced eMVs with vesicle structure, which was confirmed by TEM. Then, the collected eMVs were found to show antibiotic activity against *Bacillus subtilis* in a paper disk assay. The activity was not eliminated on penicillinase containing plate, suggesting that the activity was not derived from penicillin. We will analyze the antibiotic compounds included in the eMVs.

Penicillium chrysogenum, extracellular membrane vesicle, antibiotic activity

発表責任者：萩原大祐（hagiwara.daisuke.gb@u.tsukuba.ac.jp）

講演番号：4C01-05
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:00～ ミーティングルーム C

酵母 *Yarrowia lipolytica* の n-アルカン代謝におけるオキシステロール結合タンパク質ホモログ Osh3 の機能解析

Functional analysis of oxysterol-binding protein homolog Osh3 in the utilization of n-alkane in the yeast *Yarrowia lipolytica*

○何 智勇[1]、岩間 亮[1,2]、堀内 裕之[1,2]、福田 良一[1,2]（[1]東農大、[2]東大・微生物連携機構）
○Zhiyong HE[1], Ryo IWAMA[1,2], Hiroyuki HORIUCHI[1,2], Ryouichi FUKUDA[1,2] ([1]The Univ. of Tokyo, [2]CRIIM, UTokyo）

Yarrowia lipolytica は *n*-アルカンや油脂などの疎水性化合物を単一の炭素源として利用することができる酵母である。*Y. lipolytica* を *n*-アルカンを炭素源として培養すると、*n*-アルカンの代謝に関わるシトクロム P450 をコードする *ALK1* などの遺伝子の転写が活性化する。*ALK1* の *n*-アルカンに応答した転写制御には、転写活性化因子をコードする遺伝子 *YAS1* および *YAS2* と転写抑制因子をコードする *YAS3* が関与する(1)。我々はこれまでに、野生型株、*YAS2* 破壊株、*YAS3* 破壊株を用いた網羅的転写解析から、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* のオキシステロール結合タンパク質ホモログ遺伝子 *OSH3* のオルソログが *ALK1* と同様の発現パターンを示すこと、*Y. lipolytica* の *OSH3* 破壊株は *n*-アルカンを炭素源とした培地での生育に欠損を示すことを明らかにした(2,3)。本研究では、*Y. lipolytica* の *OSH3* の機能を明らかにすることを目的として解析を行った。*OSH3* 破壊株では、*n*-アルカンに応答した *ALK1* のプロモーター活性や転写量には欠損は見られなかった。*OSH3* と遺伝学的に相互作用する遺伝子を同定するため、*OSH3* 破壊株を炭素鎖長 10 の *n*-デカンを炭素源とした液体培地で培養することを繰り返すことにより、*n*-デカン培地で生育できるようになった抑圧変異株を単離した。得られた変異株の変異についてゲノムシーケンスにより解析を行った結果についても報告する。

(1) Fukuda, R., *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **77**, 1149-1154 (2013)、(2) 岩間ら、日本農芸化学会 2016 年度大会講演要旨集 4F032、(3) Iwama, R. *et al*., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **499**, 836-842 (2018)

The yeast *Yarrowia lipolytica* has remarkable abilities to utilize hydrophobic compounds, including *n*-alkanes, as a carbon source. Transcription of *ALK1* encoding cytochrome P450 that is involved in the oxidation of *n*-alkanes, is activated when *Y. lipolytica* is cultivated in the presence of *n*-alkanes. In the previous study, it was shown that the transcription of *OSH3*, which is an ortholog of *Saccharomyces cerevisiae OSH3* encoding an oxysterol-binding protein homolog, is upregulated in response to *n*-alkane and that the deletion mutant of *OSH3* has a defect in the growth on *n*-alkanes. In this study, we investigated the role of *OSH3* in the utilization of *n*-alkane in *Y. lipolytica*. The deletion mutant of *OSH3* did not exhibit defects in the transcription activation of *ALK1* in response to *n*-alkane. To identify genes that interact genetically with *OSH3*, we isolated and characterized suppressor mutants that gained the ability to grow in the medium containing *n*-decane.

Yarrowia lipolytica, n-alkane, oxysterol-binding protein homolog

講演番号：4C01-06
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:00～ ミーティングルーム C

酵母のタンパク質品質管理におけるエタノール耐性獲得と酒類醸造過程での挙動

Acquired Resistance to Severe Ethanol Stress on Protein Quality Control during Brewing Process in *Saccharomyces cerevisiae*

○吉田 雅偲[1]、古谷 昇[1]、藤原 久志[2]、若井 芳則[2]、井澤 真吾[1]([1]京工繊大院・応用生物、[2]黄桜株式会社)
○Masashi Yoshida[1], Noboru Furutani[1], Hisashi Fujiwara[2], Yoshinori Wakai[2], Shingo Izawa[1] ([1]Kyoto Inst. Technol., [2]Kizakura Co., Ltd.)

高濃度エタノール(10% v/v)はアルコール発酵を行う酵母にとってもストレスとなり、不溶性タンパク質やユビキチン化タンパク質の細胞内蓄積を引き起こす(*FEMS Yeast Res.*, 2019, 19: foz079)。一方、細胞を比較的弱いストレスで前処理することにより、他ストレス種も含めた強いストレスに対して耐性を獲得することが知られている (acquired stress resistance)。酵母では、低濃度エタノールによる前処理によって高濃度エタノール耐性が向上することが報告されている(*Genetics*, 2010, 186:1197–1205)。本研究では、タンパク質の品質管理 (PQC, protein quality control) における高濃度エタノールへの耐性獲得について検討を行い、6%エタノールや 37˚C での前処理によって 10%エタノールによる不溶性タンパク質の蓄積が顕著に抑制されることを明らかにした。翻訳伸長阻害剤シクロヘキシミド存在下で前処理を行った場合、不溶性タンパク質の蓄積は抑制できなかったため、前処理中の新規タンパク質合成を介して PQC 能力が向上し、続く高濃度エタノールストレスに対処できるようになったと考えられた。また、*fes1*Δ*hsp104*Δや *ssa2*Δ*ssa3*Δ*ssa4*Δなどの bi-chaperone system が十分に機能しない変異株では耐性獲得が不十分であった。そのため、前処理による bi-chaperone system の活性化が十分な耐性獲得には必要だと考えられた。一方、プロテアソームの阻害剤である MG132 を用いた解析などから、耐性獲得におけるプロテアソームの寄与は大きくないことが示唆された。以上の結果から、前処理細胞ではプロテアソームによる変性タンパク質の分解効率が向上したのではなく、タンパク質の変性自体が起きにくくなることで、変性タンパク質が蓄積しなくなったと考えられた。このような PQC における高濃度エタノールへの耐性獲得が、徐々にエタノール濃度が上昇する醸造過程でも誘導されるのか検証するために、各種の酒類醸造過程のサンプルを用いて不溶性タンパク質レベルの解析を行った。本発表では、醸造過程の解析結果についても紹介したい。

Pretreatment with mild stress is known to further improve ethanol tolerance of yeast cells, but it is not clear whether it improves protein quality control (PQC) activity and reduces levels of denatured proteins. In this study, we found that pre-treatment with mild ethanol led to the increased expression of proteins involved in PQC and mitigated the accumulation of insoluble proteins even under severe ethanol stress. These results provide new insights into the ethanol tolerance and adaptive capacity of yeast. It may also contribute to research on the physiology of yeast cells during the brewing process, where ethanol concentration gradually increases.

proteostasis, bi-chaperone system, acquired ethanol stress resistance

講演番号：4C01-07
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:00～ ミーティングルーム C

分岐鎖アミノ酸アミノ基転移酵素 Bat1 のアミノ酸置換（Ala234Asp）が酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の生理機能に及ぼす影響

Effect of the Ala234Asp replacement in the mitochondrial branched-chain amino acid aminotransferase Bat1 on the physiological function of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*

○豊川 洋一[1]、Koonthongkaew Jirasin[1]、大橋 正孝[2]、Large Christopher[3]、Dunham Maitreya[3]、高木 博史[1] ([1]奈良先端大、[2]奈良県産振セ、[3]ワシントン大)
○ Yoichi TOYOKAWA[1], Jirasin Koonthongkaew[1], Masataka Ohashi[2], Christopher Large[3], Maitreya Dunham[3], Hiroshi Takagi[1] ([1]Grad. Sch. Sci. Tech., NAIST, [2]Nara Pref. Inst. Ind. Devt., NIID, [3]Univ. Washington)

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* において、分岐鎖アミノ酸（BCAA）アミノ基転移酵素である Bat1 は BCAA の生合成経路において重要な役割を有している。先行研究（Large et al., 2020）において、ヘテロ接合性四倍体の産業用ビール醸造酵母のゲノム解析が行われた。その結果、4 本のうちの 1 本の染色体上の *BAT1* 遺伝子に Ala234Asp のアミノ酸置換を伴う変異が存在する株では、BCAA を前駆物質とする高級アルコール（イソブタノール、イソアミルアルコール）が、発酵液中に多く含まれていることが見出された。そこで本研究では、Bat1 における Ala234Asp 置換が酵母の表現型や代謝に与える影響について、実験室酵母を用いた解析を行った。その結果、変異型 Bat1 発現株（*bat1*^{A234D} 株）では野生型株と比べ、対数増殖期における生育の阻害、細胞内バリンやロイシン含量の減少、培養液中の各種高級アルコール含量の増加、炭酸ガス生成量の減少など、*BAT1* 遺伝子破壊株（*bat1*Δ株）と同様の表現型を示した。また、ウェスタンブロット解析の結果、変異型 Bat1 は細胞内で野生型酵素と同程度に存在していた。以上の結果から、Ala234Asp 置換により Bat1 が不活性化すると考えられた。さらに、Ala234Asp 置換が Bat1 の立体構造に与える影響を調べる目的で、ホモロジーモデリングを行った結果、Ala234Asp 置換は Bat1 の酵素活性に直接影響を及ぼさないことが示唆された。

In the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, the mitochondrial branched-chain amino acid (BCAA) aminotransferase Bat1 plays an important role in the synthesis of BCAAs (valine, leucine and isoleucine). Our upcoming study (Large et al., 2020) showed that the heterozygous tetraploid beer yeast strain, which natively had a variant causing one amino acid substitution of Ala234Asp in Bat1 on one of the four chromosomes, produced higher levels of BCAA-derived fusel alcohols in the brewer's wort medium than a derived strain lacking this mutation. Here, we investigated the physiological role of the A234D variant Bat1 in *S. cerevisiae*. Both *bat1*Δ and bat1^{A234D} cells exhibited the same phenotypes relative to the wild-type Bat1 strain—namely, a repressive growth rate in the logarithmic phase, decreases in intracellular valine and leucine content in the logarithmic and stationary growth phases, respectively, an increase in fusel alcohol content in culture medium and a decrease in the carbon dioxide productivity. These results indicated that amino acid change from Ala to Asp at position 234 led to a functional impairment of Bat1, although homology modeling suggested that Asp234 in the variant Bat1 did not inhibit enzymatic activity directly.

Saccharomyces cerevisiae, Bat1, fusel alcohol

発表責任者：高木博史（hiro@bs.naist.jp）

講演番号：4C01-08
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:00～ ミーティングルーム C

スレオニン脱アミノ化酵素 Ilv1 の新規変異体がイソロイシン生産と清酒醸造特性に与える影響
Effect of a novel threonine deaminase Ilv1 variant on isoleucine productivity and Sake brewing properties

○磯貝 章太[1]、小高 敦史[2]、村上 直之[2]、蘆田 佳子[1]、堀田 夏紀[2]、松村 憲吾[2]、西村 明[1]、秦 洋二[2]、石田 博樹[2]、高木 博史[1] ([1]奈良先端大・バイオ、[2]月桂冠・総研)
○Shota Isogai[1], Atsushi Kotaka[2], Naoyuki Murakami[2], Keiko Ashida[1], Natsuki Hotta[2], Kengo Matsumura[2], Akira Nishimura[1], Yoji Hata[2], Hiroki Ishida[2], Hiroshi Takagi[1] ([1]Grad. Sch. Sci. Tech., NAIST, [2]Res. Inst., Gekkeikan Sake Co., Ltd.)

イソロイシンは、成長促進、肝機能や筋肉の強化、疲労回復などの生理機能を有する必須アミノ酸である。また、イソロイシンの異化反応によって生成する活性アミルアルコールは、酒類や食品の香気成分の一種である。以上の背景から、産業用酵母のイソロイシン生産性を強化し、醸造・発酵食品に応用することができれば、これらの食品の呈味性や香気性を変化させ、高付加価値化につながることが期待できる。本研究では、イソロイシンを高生産する清酒酵母を育種し、その高生産メカニズムを解明するとともに、実際の清酒醸造への応用を目的としている。

実用清酒酵母株（月桂冠株式会社保有）に突然変異処理を施し、イソロイシンの毒性アナログ（*O*-メチルスレオニン）に耐性を示す株を分離した。耐性株の中から、細胞内イソロイシン含量が親株の約 2 倍に増加した GK9-I48 株を取得した。本株の変異点を解析したところ、イソロイシン生合成の律速酵素であるスレオニン脱アミノ化酵素の遺伝子（*ILV1*）に新規のアミノ酸置換（His480Tyr）を伴う変異を同定した。続いて GK9-I48 株を用いて清酒醸造試験を行った結果、親株と比較して、清酒中のイソロイシン含量は変化しなかったが、イソロイシンに由来する活性アミルアルコールや酢酸活性アミルの生産性が大きく増加した。現在、実験室酵母を用いて、*ILV1* に導入された変異がイソロイシン生産性に与える影響の解析を進めており、その結果についても発表する。(本研究は、農研機構生研支援センター「イノベーション創出強化研究推進事業」の支援を受けて実施した)。

Isoleucine (Ile) possesses a variety of physiological functions and is the precursor of aromatic compounds of alcoholic beverages and foods. Thus, overproduction of Ile in industrial yeasts is expected to change the taste and flavor of fermented foods. In this study, we breed an Ile-overproducing mutant of Sake yeast for Sake brewing and elucidate the high production mechanism of Ile in the mutant. From the Ile toxic-analog resistant mutants, we obtained the Ile overproducing strain, GK9-I48. We then identified a novel mutation with amino acid substitution (His480Tyr) in the *ILV1* gene of GK9-I48. Next, we conducted Sake fermentation test with GK9-I48. Although the amount of Ile in Sake mash was the same as wild type; the productivity of active amyl alcohol and its acetate ester were greatly increased. We now analyze the effect of the *ILV1* mutation on Ile productivity.

isoleucine, threonine deaminase, sake brewing

発表責任者：磯貝　章太（s-isogai@bs.naist.jp）

講演番号：4C01-09
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:00～ ミーティングルーム C

味噌・醤油酵母 *Zygosaccharomyces* sp.の接合制御

Mating control of *Zygosaccharomyces* sp. yeast

○尾形 智夫、黒木 克明（前橋工科大学大学院）
○Tomoo OGATA, Katsuaki KUROKI (Maebashi Institute of Technology)

【目的】*Zygosaccharomyces* sp.酵母は、味噌醤油製造に使用される酵母である。この酵母の接合は、古くから報告されているが、接合培地に醤油麹エキスの利用等が必要とされ、一般的な実験に使用するには難点があった。そこで、今回、*Zygosaccharomyces* sp.酵母の接合条件を再検討するとともに、接合性によって制御されると予想される遺伝子群の発現制御機構について調べた。
【方法】*Zygosaccharomyces* sp.酵母の接合は、薬剤耐性及び栄養要求性の相補を利用して、測定した。接合性特異的に発現していると予想される *STE6*、*MFα1* 遺伝子発現は、*Zygosaccharomyces* sp.酵母から、プロモーター領域をクローニングし、*lacZ* 遺伝子に接続させたレポーターアッセイによって測定した。
【結果】*Zygosaccharomyces* sp.酵母の接合は、接合培地を窒素源飢餓培地にすることで確認された。接合性 a で、遺伝子発現がおこると予想された *STE6* 遺伝子プロモーターに接続させた lacZ 活性は、*Zygosaccharomyces* sp. NBRC1877 *ura*3Δ株(*MAT***a**)を、窒素源飢餓培地で培養することで、発現がみられた。接合性αで、遺伝子発現誘導がおこると予想された *MF*α1 遺伝子は、*Zygosaccharomyces* sp. NBRC1876 *ura*3Δ 株 (*MAT*α) を、窒素飢餓培地で培養することで、発現がみられ、*Zygosaccharomyces* sp.酵母の接合性特異的遺伝子群は、接合と同様に、窒素源飢餓条件下で発現すると考えられた。また、*Zygosaccharomyces rouxii* の基準株(type strain)の一つである *Z. rouxii* CBS732 由来の *Z. rouxii* DL2 株(*MAT* **a**)では、*STE12* 遺伝子にフレームシフト変異があり、野生型 *STE12* 遺伝子の導入により、接合能が回復し、かつ、*STE6* 遺伝子プロモーターに接続させた lacZ 活性が上昇した。*Z. rouxii* CBS732 由来の *MAT* 遺伝子座は、他の *Zygosaccharomyces* sp.酵母とゲノム構造が異なると考えられるが、それにも関わらず、Chromosome F 上の *MTL* (Mating type like loci)が、接合遺伝子座であると考えられた。
Mating was observed when *Zygosaccharomyces* sp. yeast was subjected to nitrogen starvation conditions. In nitrogen starvation conditions, *Zygo STE6* was expressed specifically for mating type **a**, and on the other hand, *Zygo MFα1* was expressed specifically for mating type α . Mating between yeast strains derived from type strain *Z. rouxii* CBS732, has not been shown. However, under nitrogen starvation conditions, mating was also observed between *Z. rouxii* CBS732 derived strains transformed by wild-type *Zygo STE12* gene.

Zygosaccharomyces, mating, nitrogen starvation

発表責任者：尾形智夫（tomoo.ogata@maebashi-it.ac.jp）

講演番号：4C01-10
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:00～ ミーティングルーム C

味噌・醤油酵母 *Zygosaccharomyces* sp.の接合性特異的遺伝子の発現制御

Expression regulation of mating specific genes in miso and soy sauce yeast *Zygosaccharomyces* sp.

○福田 萌々花、黒木 克明、尾形 智夫（前橋工科大）
○Momoka Fukuda, Katsuaki Kuroki, Tomoo Ogata (Maebashi Institute of Technology)

【目的】*Zygosaccharomyces* sp.酵母は、味噌醤油製造に使用される酵母である。高品質な味噌醤油製造に寄与するため、*Zygosaccharomyces* sp.酵母の接合育種を試みている。本研究では、*Zygosaccharomyces* sp.酵母の接合性特異的遺伝子群の発現制御機構について調べた。なお、酵母の接合性 a 特異的遺伝子群の接合性特異的発現制御については、*Candida albicans* に代表される酵母祖先型では、転写活性化因子 Mat**a**2 による発現制御から、生命進化の過程で、*Saccharomyces cerevisiae* に代表される分岐型では、転写抑制因子 Matα2 による発現制御に移行したとの考えが提唱されており [1)]、これについても検討した。
【方法】*Zygosaccharomyces* sp.酵母から接合性 **a** で発現されると予想される *STE6* 遺伝子のプロモーター領域をクローニングし、*lacZ* 遺伝子に接続させたレポーターアッセイによって測定した。
【結果】*Zygosaccharomyces* sp.酵母の *STE6* 遺伝子プロモーターに接続させた lacZ 活性は、接合が生じる窒素源飢餓培地で培養することで発現がみられた。当該プロモーター配列には、CRE(cis-regulatory element)と予想される 31b の配列があり、CRE の中央には Mcm1 結合配列の 10b があり、一方の末端 7b は、*C. albicans* の Mat**a**2 結合配列と相同性があった。反対側の末端 7b は、*S. cerevisiae* の Matα2 結合配列と相同性があった。この CRE 配列を除去することで lacZ 活性が消失した。また、Mat**a**2 結合配列を除去することで lacZ 活性が大幅に低下した。以上のことより、*Zygosaccharomyces* sp.酵母の接合性 **a** 特異的遺伝子群は、31b の CRE によって転写制御されており、Mat**a**2 結合配列は、転写活性化配列として機能していると考察した。また、当該 CRE 中の Mat**a**2 結合配列と予想される 7b を Matα2 結合配列に変換させても lacZ 活性は維持されていたことより、生命進化の過程で Mat**a**2 結合配列が Matα2 結合配列に移行する考えは支持されると考えている。

1）Baker, C. R. et al. Cell Vol.151, 80-95 (2012)

Zygosacchqaromyces sp. yeast is used in the production of miso and soy sauce. In this study, we investigated the expression control mechanism of mating type specific genes in *Zygosaccharomyces* sp. yeast. The promoter region of the *STE6* gene, which is expected to be expressed in mating type **a**, was cloned and assayed by a reporter assay connected to the *lacZ* gene. This *Zygo STE6*-*lacZ* was expressed in a nitrogen starvation medium.

Zygosaccharomyces, mating type specific genes, regulation

発表責任者：尾形智夫（tomoo.ogata@maebashi-it.ac.jp）

講演番号：4C01-11
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:00～ ミーティングルーム C

電気制御発酵に向けた Shewanella oneidensis MR-1 株の電子受容能力の向上

Improvement of electron-accepting ability of Shewanella oneidensis MR-1 towards development of electro-fermentation

○田中 勇吾[1]、富岡 優樹[1]、鈴木 志野[2]、石井 俊一[3]、高妻 篤史[1]、渡邉 一哉[1]([1]東薬大生命、[2]国立研究開発法人宇宙航空研究開発機構、[3]国立研究開発法人海洋開発機構)
○Yugo TANAKA[1], Yuki TOMIOKA[1], Shino SUZUKI[2], Shun'ichi ISHII[3], Atsushi KOUZUMA[1], Kazuya WATANABE[1] ([1]Tokyo Univ.Pharm.Life Sci., [2]JAXA, [3]JAMSTEC)

【背景と目的】電気制御発酵 (Electro-fermentation; EF) とは、従来の発酵法と比べて高還元・高付加価値の物質が合成できると期待される次世代の発酵技術である。EF では、細胞外電子伝達系を介して電極と電子の授受が可能な細菌 (電気化学活性細菌) を用い、これらの細菌の細胞内酸化還元バランスを電極によって制御することで発酵反応を促進させる。*Shewanella oneidensis* MR-1 株は電気化学活性細菌のモデル生物であり、遺伝子操作が容易なことから電気制御発酵におけるホスト株として有望視されている。しかし、MR-1 株を用いて効率の良い電気制御発酵プロセスを構築するためには、電極からの電子受容能力を大幅に向上させる必要がある。電子受容能力の向上には、細胞外電子伝達系を構成する外膜シトクロムの高発現、あるいはより電子受容活性が高い（酸化還元電位が低い）外来シトクロムの導入が有効と考えられる。そこで本研究では、MR-1 株において外膜シトクロムの発現を誘導する cAMP の過剰生産株、および低酸化還元電位環境のメタゲノムから発見されたシトクロム (MmcX) の導入株を構築し、これらの遺伝子改変株の電極からの電子受容能力を評価した。
【方法と結果】MR-1 株において cAMP 合成酵素 (アデニル酸シクラーゼ) をコードする *cyaC* の過剰発現株を 3 電極系電気化学セル（作用極電位: –0.6 V vs. Ag/AgCl、電子受容体: 20 mM フマル酸）に植菌し、電子受容能力（カソード電流量）を評価した結果、本株は MR-1 野生株よりも約 2 倍高い電流を生成した。また、MR-1 株の内因性外膜シトクロム (OmcA および MtrC) を低電位環境メタゲノム由来のシトクロム (MmcX) に置換した株を作製し、同様に電子受容能力を評価した結果、本遺伝子改変株も野生株より約 2 倍高い電流を生成した。以上の結果は、電気化学活性細菌の電子受容能力の向上には外膜シトクロムの改変と制御が重要であることを示している。今後は本研究で得られた知見を基に MR-1 株の電子受容能力をさらに向上させ、電気制御発酵の高効率化を図る予定である。

Electro-fermentation(EF) is a next-generation fermentation system that facilitates the production of value-added chemicals by electrochemically active bacteria (EAB) with the aid of electrodes. To construct efficient EF processes, however, the ability of EAB to uptake electrons from electrodes should be significantly improved. In this study, we constructed a *cyaC*-overexpressing strain and *mmcX*-expressing strain from a model EAB, *Shewanealla oneidensis* MR-1, and found that these mutants generated two-fold higher cathodic current than that of wild-type MR-1 in the presence of low-potential electrodes. These results indicate that the replacement and up-regulation of outer membrane cytochromes enable enhanced electron-receiving abilities of EAB.

Electro-fermentation, Electrochemically active bacteria, gene regulation

発表責任者：田中勇吾（s168043@toyaku.ac.jp）

講演番号：4C01-12
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:00～ ミーティングルーム C

組換鉄酸化細菌の電気培養による CO_2 由来エチレン生成効率化の検討

Electrochemical process accelerates ethylene production from CO_2 in recombinant iron-oxidizing bacteria

○中村 孝道[1]、谷口 惠梨[1]、平野 伸一[2]([1]熊谷組技研、[2]電中研環境)
○Takamichi NAKAMURA[1], Eri TANIGUHI[1], Shin-ichi HIRANO[2] ([1]KumagaiGumi, [2]CRIEPI)

背景と目的：CO_2 排出量の大幅削減やカーボンニュートラルの観点からバイオプロセスによる CCU（Carbon Capture and Utilization）技術の開発による低炭素・炭素循環型社会の実現に大きな期待がかけられているものの，現時点では CO_2 の処理能力や有用物質生産効率に課題があり実用化のためには大きなイノベーションが必要といえる．バイオプロセスによる CCU 技術の実用化を近づけるためには基本技術の選択肢を増やすことが重要であると考え，化学合成独立栄養細菌である好酸性鉄酸化細菌（*Acidithiobacillus ferrooxidans*）を遺伝子組換えし，CO_2 を原料としてエチレンを生産する組換株を構築した．今回，組換株のエチレン生産高度化を目的とし，組換株に対し電気培養技術を適用した培養およびエチレン生成実験を実施した．
方法と結果：ジャーファーメンターをベースとして，イオン交換膜で隔てた 2 層構造にそれぞれ電極を搭載し通電を可能とした通電型培養装置を作製した．CO_2 利用エチレン生産鉄酸化細菌組換株（AF-rEF2）は，9K 培地（pH2.0）を用いて空気をバイアル瓶に密閉したバッチ培養と通気により基質ガスを供給した通電型培養装置による半連続培養を行った．培地の ORP が 450 以上となり十分に鉄が酸化された状態になってから電圧を印加し還元電流を与えた．培養中を通してエチレン生成は観察されたが，ORP 値が下がり少し還元的な状態になるとよりエチレンを生成することが分かった．バッチ培養と比較して細胞濃度で 100 倍以上，エチレン生成速度で 1000 倍以上の通電による向上効果が確認できた．
今後の展望：CO_2 の変換率が低いのが課題である。鉄酸化細菌組換株の改良と通電による酸化還元状態の制御方法の最適化により，さらなるエチレン生産性向上を目指していきたい．

Chemolithotrophic, acidiphilic *Acidithiobacillus ferrooxidans*, was genetically recombined to construct a recombinant strain that produces ethylene from CO_2. In this study, we conducted ethylene production experiment applying the electrochemical cultivation system for the purpose of improving the ethylene production of the recombinant strain. Ethylene production in recombinant strain increased when a reduction current was applied after the ORP of the medium was more than 450 and iron was sufficiently oxidized. As a result, applying the electrochemical process, we could improve the cell concentration to 100 times or more, the ethylene production rate to 1000 times or more.

Electrochemical process, CO_2 utilization, Chemolithotrophic

発表責任者：中村孝道（takamichi.nakamura@ku.kumagaigumi.co.jp）

講演番号：4C01-13
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:00～ ミーティングルーム C

細胞膜結合型 D-マンノース異性化酵素の発見と異性化糖の新しい製造法

Discovery of membrane-bound D-mannose isomerase and its application to high fructose syrup production

○足立 収生、片岡 尚也、松下 一信、赤壁 善彦、薬師 寿治（山口大農）
○Osao ADACHI, Naoya KATAOKA, Kazunobu MATSUSHITA, Yoshihiko AKAKABE, Toshiharu YAKUSHI (Yamaguchi Univ.)

目的 人には不消化なために用途がコンニャク製造に限定されてきた蒟蒻芋の、食品産業への多様な用途開発を行ってきた(*BBB*, **84,** 2160-73, 2020)。蒟蒻芋を麹で完全に加水分解すると、マンノース(M)とグルコース(G)を含む糖液が得られるので、異性化糖の新しい製造法の開発を目指した。方法 酢酸菌の培養は糖と酵母エキスを含む培地で行った。M や G や果糖の分析・定量には酢酸菌から精製した基質特異性の高い酵素を使って行った。結果と考察 酢酸菌に細胞膜結合型マンノース異性化酵素(MMI)が見つかった。糖質異性化酵素が細胞膜結合型で得られたのは世界初の知見で、しかもその反応最適 pH は 5-6 で、熱にも安定であった。従来の糖質異性化酵素は例外なく細胞質酵素で、最適 pH は 8-9 にあり、酵素生成には誘導基質と金属が必要で、加熱にも不安定な酵素が多い。そのような細胞質由来の糖質異性化酵素を使用した現行の異性化糖製造法には、多くの技術的欠陥が指摘されてきた。蒟蒻芋を原料とする異性化糖製造に MMI を使用すると、何度も反応 pH を変更することなく終始 pH 5-6 で、異性化糖の新しい製造を実現できる。酢酸菌細胞は細胞表層に MMI を結合しているので、それ自体典型的な固定化細胞触媒であり、酵素活性を失わず長期間安定に触媒機能を発揮した。

Membrane-bound D-mannose isomerase (MMI) (EC 5.3.1.7) catalyzing inter-conversion of D-mannose to D-fructose was discovered in acetic acid bacteria. Cell fractionation confirmed MMI to be a typical membrane-bound enzyme, while all sugar isomerases so far reported occur in the cytoplasmic fraction. Since MMI was tightly bound with bacterial membrane, the bacterial cells themselves work as an immobilized cellular catalyst. Alternatively, MMI was solubilized and purified to homogeneity. MMI showed the optimum pH at 5-6 showing clear contrast to all cytoplasmic sugar isomerases having the optimum pH at 8-9. It is advantageous to use MMI to develop a new method for high fructose syrup production.

acetic acid bacteria, high fructose syrup, membrane-bound mannose isomerase

発表責任者：足立収生（osao@yamaguchi-u.ac.jp）

講演番号：4C01-14
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:00～ ミーティングルーム C

バイオ電池を外部 エネルギー源としたリンゴ酸酵素逆反応による 炭酸固定化システム

HCO_3^- fixation system using malic enzyme reverse reaction with biofuel cell as external energy source

○上床 翔太郎、大田 竹留、髙村 映一郎、坂元 博昭、里村 武範、末 信一朗 (福井大工)
○Shotaro Uwatoko, Takeru Oota, Eiichiro Takamura, Hiroaki Sakamoto, Takenori Satomura, Shin-ichiro Suye (Fukui Univ.)

近年、温室効果ガスの大気中における濃度上昇を原因の一つとする地球温暖化が問題となっており、特に二酸化炭素 (CO_2) は最も地球の温度上昇に寄与しているとされている。また、世界的なエネルギー需要の増加が見込まれている。したがって、効率的に CO_2 を還元しエネルギーとして利用することは、これらの課題への有効な対策となる。しかし、CO_2 の化学変換は大きなエネルギーを必要とするため、従来の CO_2 還元技術においては、高価な貴金属の利用や高温高圧の条件下での反応が必須となっている。一方、ギ酸脱水素酵素やリンゴ酸酵素をはじめとした、酵素を用いた生化学的 CO_2 還元は、反応条件が穏やかであるという特徴がある。

本研究室では、*Brevundimonas diminuta* 由来の NAD 依存型リンゴ酸酵素の逆反応を用いて、炭酸を固定化し、有用な化学物質であるリンゴ酸生成を検討してきた。本研究では、外部エネルギー源として、電極上に修飾した微生物由来の酸化還元酵素によって電気エネルギーを取り出す、バイオ電池（BFC）を組み合わせることで、より環境負荷の低い反応系を構築した。BFC は、バイオマスを直接燃料として利用するためカーボンニュートラルである。ここでは、BFC に超好熱菌由来の酵素を用いることで、電池の長寿命化を達成している。

構築した反応系によって炭酸の固定化を行った結果、35 時間の反応において 100 mM のピルビン酸から 38 mM のリンゴ酸の生成および、等モル量の炭酸の固定化に成功した。

There are a lot of CO_2 fixation methods, especially, enzymatic fixation of CO_2 features various advantage, such as low temperature, mild conditions. In particular, enzyme reaction using formate dehydrogenase with NADH regeneration has been investigated. The conversion of CO_2 to malic acid, which involves valuable for industry, was also researched. These reactions require external energy for NADH regeneration, and CO_2 reduction systems using biofuel cells (BFCs) and microbial fuel cells as external power sources are highly sustainable because they use renewable energy sources.

In this study, BFCs were used as external energy sources and CO_2 was reduced using the reverse reaction of pyruvic acid to malic acid by NAD-linked malic enzyme from *Brevudimonas diminuta*.

HCO_3^- fixation, Bio fuel cells, Malic enzyme

講演番号：4C03-01
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:00～ ミーティングルーム C

マイクロ流体デバイスによる微小環境を制御した人工細菌凝集体の開発

Controlling bacterial microenvironment with microfluidic encapsulation

○野村 佳祐[1]、高橋 晃平[2]、小川 和義[3]、豊福 雅典[3,4]、野村 暢彦[3,4]、Utada Andrew[3,4] ([1]筑波大・生命環境、[2]筑波大院・生命環境、[3]筑波大・生命環境系、[4]筑波大・MiCS)
○Keisuke NOMURA[1], Kohei Takahashi[2], Kazuyoshi Ogawa[3], Masanori Toyohuku[3,4], Nobuhiko Nomura[3,4], Andrew Utada[3,4] ([1]Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, [2]Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, [3]Fac. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, [4]MiCS, Univ. Tsukuba)

実環境下の多くの細菌はバイオフィルムと呼ばれる集団を形成し生存する。その一例として、バイオフィルムの内部（core）と外部(shell)にそれぞれ異なる細菌種が局在分布する core-shell 構造をとることで、菌体が単一種で存在する場合とは異なる表現型を示すことが知られている。この現象は、菌体分布やバイオフィルムの大きさなどの構造により、バイオフィルム中の各菌体を取り巻く微小環境が変化し、内部の遺伝子発現に影響するためだと考えられているが、これらの定量的関連性については、未解明な点も多い。しかし、従来の解析手法では、バイオフィルムの大きさや内部の菌体分布の精密な制御が難しく、定量的解析に限界が生じる。そこで本研究では、core-shell 構造を μm 単位で模倣した人工細菌凝集体を開発・解析することを目指した。凝集体の大きさ、菌体分布の制御には、マイクロ流体デバイスのドロップレットシステムを用いた。異なる蛍光タンパク（赤、緑）を持つ同株の緑膿菌を凝集体の内外に局在させることを意図してアルギン酸ゲルに包括し、凝集体を作製した。共焦点レーザー顕微鏡を用いた３D 解析により、凝集体の core に赤色、shell に緑色の蛍光の局在が確認され、目的の凝集体の作製に成功した。また、様々な厚さの shell を持つ凝集体の作製にも成功した。これらの結果は、細菌凝集体の大きさや内部の菌体分布の人工的な制御可能性を示す、本技術は顕微鏡の蛍光イメージングと組み合わせることで、バイオフィルムの表現型の新たな解析手法として利用可能であると考えられる。Most bacteria in the environment exist as social communities, called biofilms. Biofilms can acquire complex structure that affects the biology of internal cells. Heterogenous gene expression can be observed within single-species biofilms due to heterogeneity in the local microenvironment surrounding each cell. Multi-species biofilms with stratified structures similarly exhibit different phenotypes compared to single-species biofilms. Due to limitations of conventional biofilm analysis and the inability to precisely control the structure of the microenvironment, how a heterogenous microenvironment affects biofilm biology and ecology are not clear. This study aims to generate precisely structured bacterial aggregates to serve as novel model biofilms with microfluidic drop generation and encapsulation. We demonstrate control over the formation of bacterial aggregates with core-shell structures with various sizes and ‘shell’ thicknesses and image these using 3D confocal microscopy. These results are a first step towards controlling the size and bacterial distribution in the aggregates, which will be used in the analysis of bacterial phenotypes that arise within biofilms.

Biofilm, Microfluidics, Microenvironment

発表責任者：野村佳祐（nomura.keisuke.sg@alumni.tsukuba.ac.jp）

講演番号：4C03-02
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:00～ ミーティングルーム C

皮膚細菌が形成するバイオフィルムの時空間的解析

Spatio-temporal analysis of skin microbiota biofilms

○中山 瑞鵬[1]、釣流 香織[2]、Li Xiaojie[2]、野村 暢彦[3,4]、尾花 望[5]、アンドリュー ウタダ[3,4] ([1]筑波大生命環境、[2]筑波大学院生命環境、[3]筑波大生命環境系、[4]筑波大 MiCS、[5]筑波大医学医療系 TMRC)
○Mizuho NAKAYAMA[1], Kaori TURYU[2], シャオジエ リー[2], Nobuhiko NOMURA[3,4], Nozomu OBANA[5], Andrew Utada[3,4] ([1]Sch.Life Environ.Sci.,Univ.Tsukuba, [2]Grad.Sch.Life Environ. Sci.,Univ. Tsukuba, [3]Fac.Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, [4]MiCA,Univ. Tsukuba, [5]TMRC,Fac.Medicine,Univ. Tsukuba)

ヒトの皮膚上に棲息する皮膚細菌は、皮膚表面上に付着してバイオフィルム様の生活様式を示すと考えられる。しかし、皮膚細菌の皮膚表面上での生活環や挙動に関する知見は乏しい。本研究では皮膚常在細菌である表皮ブドウ球菌とアクネ菌を用いて、皮膚細菌間相互作用が複合バイオフィルムの 3 次元構造に与える影響の解明を目的とした。
マイクロタイタープレート上に形成させたバイオフィルムの定量及び顕微鏡観察の結果、両細菌を共培養すると、単独培養時と比べてバイオフィルム量が有意に増加した。顕微鏡観察により複合バイオフィルム中で両細菌が観察されたことから、両細菌は共存して協調的に複合バイオフィルムを形成することが明らかとなった。また複合バイオフィルム形成中の *C. acnes* 定着には、表皮ブドウ球菌由来の eDNA が寄与することが示唆された。皮膚表面の形状は平坦ではなく、様々な構造を有しており（皺・毛穴）、これらの表面構造も複合バイオフィルムの挙動に影響を与えると予想される。そこで我々は皮膚構造を模倣した新奇デバイスを作製した。本発表では本デバイスを用いた複合バイオフィルムの 3 次元構造についても報告する。

Skin microbiota habit human skin surface, which adhere to the skin surface and survive in mixed species biofilms. Skin-bacterial interactions influence mixed biofilm formation as well as host-skin bacterial interactions. However, little is known about the behavior of skin bacteria on the skin surface. Using microscopic techniques and microfluidics device, we elucidate skin-bacterial interactions within the 3D mixed biofilms formed by common skin indigenous bacteria, *Staphylococcus epidermidis* and *Cutibacterium acnes*.
Co-culture of *S.epidermidis* and *C. acnes* induces eDNA production of *S. epidermidis,* resulting increased biofilm formation in microtiter plates (flat surfaces). Within the mixed biofilm, both bacteria coexist, suggesting that cooperative interaction between them enhances the biofilm formation. Currently, we elucidate the interaction between them within the 3D mixed biofilm on skin surfaces using a novel device that mimic the skin surface (wrinkles and pores).

biofilm, skin bacreria, skin-bacterial interacrions

発表責任者：中山　瑞鵬（mizuhoyadeyade@gmail.com）

講演番号：4C03-03
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:00～ ミーティングルーム C

山廃酒母由来 *Lactobacillus plantarum* LP-2 株と清酒酵母間の共凝集とバイオフィルム形成

Co-aggregation and Biofilm Formation between *Lactobacillus plantarum* LP-2 strain and Sake Yeast

○藤原 久志、若井 芳則（黄桜株式会社）
○Hisashi FUJIWARA, Yoshinori WAKAI (Kizakura Co., Ltd)

【目的】我々は自社の山廃酒母から桿状乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* LP-2 株を分離し、これを用いて香味に特長を有する山廃酒母仕込清酒を醸造することに成功している。今回 LP-2 株が酵母と凝集体を形成すること、さらに山廃仕込中における共存の形とその酒質への影響について報告する。
【微生物】乳酸菌は自社で分離した桿状乳酸菌 LP-2 と *L. sakei* LS-4 株、それぞれの Type strain の *L.plantarum* NBRC15891、*L. sakei* NBRC15893 を用いた。清酒酵母については、協会 7 号(K-7)、泡なし協会 701 号(K-701)を用いた。
【結果と考察】LP-2 と清酒酵母は、山廃酒母中で共凝集すると同時に、*in vitro* で混合種バイオフィルムを形成した。この現象は、LS-4 や NBRC15891、NBRC15893 では見られなかった。また、共凝集反応は、K-7 より K-701 の方が顕著であった。共凝集反応は、低 pH(<3.0)、熱処理した LP-2、D-mannose 存在下では発生しなかったため、この作用は酵母表面のマンナン層と乳酸菌表面のタンパク質との相互作用によると推測された。さらに、山廃仕込試験により、LP-2 は NBRC15891 よりも酒母完成時の酸度が上昇し、製成酒も香味に違いが確認された。

[Purpose] We have isolated *Lactobacillus plantarum* LP-2 strain from our brewery and succeeded in brewing *Yamahai-shikomi* sake with a characteristic aroma and taste by employing the strain. In this study, we report that the LP-2 strain forms aggregates with yeast and the effect of the coexistence on the quality of the sake.[Microorganisms] LP-2 strain and *L. sakei* LS-4 strain also isolated from our brewery, and their type strains, *L. plantarum* NBRC15891 and *L. sakei* NBRC15893 were used as lactic acid bacterium. *Kyokai* No. 7 (K-7) and non-foaming *kyokai* No. 701 (K-701) were used as sake yeasts. [Results and Discussion] LP-2 and sake yeast co-aggregated in *Yamahai-shubo* and simultaneously formed a mixed-species biofilm *in vitro*. This phenomenon was not observed for LS-4, NBRC15891, and NBRC15893. The co-aggregation reaction was more enhanced in K-701 than in K-7. Co-aggregation did not occur at lower than pH 3.0 and in the presence of heat-treated LP-2 and D-mannose, suggesting that this action was due to the interaction between the mannan layer on the yeast surface and the proteins on the surface of the lactobacilli. Furthermore, the test brewing of *Yamahai-shikomi* sake showed that LP-2 had a higher acidity at the end of *Yamahai-shubo* preparation than that of NBRC15891, and their differences in aroma and taste were examined in the brewed sake.

Lactobacillus plantarum, Biofilm, sake yeast

発表責任者：藤原　久志（fujiwara_hisashi@kzkappa.co.jp）

講演番号：4C03-04
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:00～ ミーティングルーム C

Cellular dynamics upon cell fusion in the co-culture between compatible/incompatible strains in the industrial filamentous fungus *Aspergillus oryzae*

○Chan LU[1], Noriko MORI[1], Takuya KATAYAMA[1,2], Ryota SAITO[3], Kazuhiro IWASHITA[3], Jun-ichi MARUYAMA[1,2] ([1]Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo, [2]CRIIM, UTokyo, [3]NRIB)

[Background]

In filamentous fungi, genetically different strains within the same species physically interact via cell fusion, and their nuclei can co-exist in the common cytoplasm, which is called heterokaryon. Upon cell fusion between genetically incompatible strains, in contrast, growth inhibition or cell death are generally induced in the heterokaryon. In *Aspergillus oryzae*, the filamentous fungus used in Japanese food fermentation, numerous genetically-diverse strains are used selectively for different purposes (*e.g.* sake, soy sauce and *miso*), and some of strains are co-cultured in brewing processes experiencedly for fermentation stability. Previously, our auxotrophic complementation assay by forced protoplast fusion revealed that strains from distinct phylogenetic clades are mostly incompatible but that the same phylogenetic strains are compatible[1)]. However, it remains elusive on the physical interaction in the co-culture between compatible/incompatible strains. In this study, we aim to directly provide a cell-level evidence for physiological responses when co-culturing compatible/incompatible strains in *A. oryzae*.

[Result]

We suspected that strains with higher self-fusion efficiency would allow to observe the cellular response upon cell fusion between compatible/incompatible strains. Hence, to quantitatively evaluate the self-fusion ability of 34 *A. oryzae* strains, two uridine/uracil auxotrophic strains (Δ*pyrF* and Δ*pyrG*) were co-cultured, and the ratio of heterokaryotic cells growing without the auxotrophic requirements was analyzed[2)]. We found higher self-fusion efficiency (>1%) in 5 strains belonging to distinct phylogenetic clades. By CRISPR/Cas9 system[3)], the strains were labeled by expressing the fluorescence proteins EGFP and mCherry, and time-course fluorescence observation was performed in the co-culture with compatible/incompatible strain pairs. While compatible strain pairs showed fluorescence mixing after cell-to-cell contact/fusion, fluorescence loss occurred in the fused cells of incompatible strain pairs. This observation is the first time to directly demonstrate cellular dynamics upon cell fusion between compatible/incompatible strains in *A. oryzae*, which would help understanding of cell-to-cell recognition mechanism in intra-species.

1) Lu *et al.*, *Annual meeting of JSBBA* (2020) 3A10a09. 2) Tsukasaki *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* (2014) 78, 1254-1262. 3) Katayama *et al.*, *Appl Environ Microbiol.* (2019) 85, e01896-18.

Aspergillus oryzae, incompatibility, co-culture

発表責任者：丸山 潤一（amarujun@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：4C03-05
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:00～ ミーティングルーム C

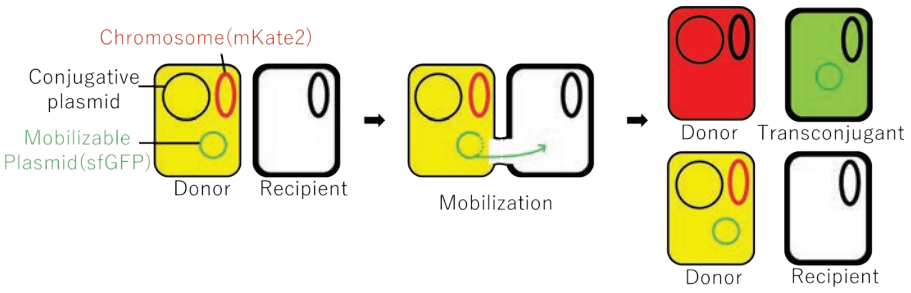
グラム陽性細菌の接合プラスミド pLS20 の接合伝達ダイナミクス

Dynamics of bacterial conjugation mediated by pLS20, a conjugative plasmid of gram positive bacteria

○森 光太郎[1]、Valeria Verrone[2]、石川 周[1]、Anil Wipat[2]、吉田 健一[1] ([1]神戸大イノベ、[2]ニューキャッスル大学)
○Kotaro MORI[1], Valeria VERRONE[2], Shu ISHIAKAWA[1], Anil WIPAT[2], Ken-ichi YOSHIDA[1] ([1]Kobe Univ., [2]Newcastle Univ.)

細菌は自然形質転換による外来遺伝子の獲得のみならず、接合伝達と呼ばれる水平方向の遺伝子伝播にて他細菌から遺伝子を獲得する。*B. subtilis* の接合プラスミド pLS20 は液体培地にて遺伝子供与菌と受容菌をわずか 15 分間混合するだけで効率的にその伝達を完了する。しかし、接合伝達の詳細なダイナミクスについては未だ解明されていない。

そこで接合伝達装置を過剰に発現した供与菌株を作成し、供与菌と受容菌を様々に異なる比率で混合接合伝達に供したところ、受容菌や供与菌のコロニー数に有意な減少が観察された。複数種の蛍光タンパク質にて供与菌・受容菌・形質転換体の区別を可能とし、フローサイトメーターおよび顕微鏡にて解析を行ったところ、この現象について細胞同士の接着集合と細胞死が関与していることが示唆された。



Bacterial conjugation is one of the major horizontal transfer systems, which enables genetic element transferred from one cell to another. pLS20 is a conjugative plasmid of *B. subtilis* that mediates conjugation efficiently in liquid culture within 15 min, however the mechanism and dynamics of its function have not been fully elucidated.

In order to analyze the conjugation dynamics of pLS20, we constructed a donor strain whose conjugation machinery was overexpressed and conducted a series of experiments in different ratios of donors and recipients participating in conjugation. Overexpression of conjugation machinery resulted in significant difference in colony formation of both donors and recipients. Fluorescent protein markers were used to distinguish between donors, recipients, and transconjugants, and microscopic and flow cytometric analyses suggested that the overexpression of conjugation machinery provoked coaggregation and death of the cells.

bacterial conjugation, horizontal gene transfer, bacillus subtilis

発表責任者：森 光太郎（gtmrktr@outlook.jp）

講演番号：4C03-06
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:00～ ミーティングルーム C

黄麹菌 *Aspergillus oryzae* の転写因子 PrtR の解析

Study on transcription factor PrtR of *Aspergillus oryzae*

○田中 優花子、西岡 佐和子、辻 僚太郎、山形 洋平（東京農工大農）
○Yukako TANAKA, Sawako NISHIOKA, Ryotaro TSUJI, Youhei YAMAGATA (Tokyo Univ. of Agriculture and Technology)

黄麹菌 *Aspergillus oryzae* の有する転写因子 PrtR は他の *Aspergillus* 属で見出されている PrtT のオルソログであり、広範な分泌型ペプチダーゼ遺伝子の転写を制御すると考えられている。本研究では黄麹菌の PrtR 欠損株（Δ*prtR* 株）を作製し、PrtR の制御下にある遺伝子の同定、制御機構の解明を目的とした。

まず、カゼインを窒素源とした液体培地で Δ*prtR* 株を培養し、ペプチダーゼ遺伝子の転写解析を行った。その結果、セリンタイプカルボキシペプチダーゼ (CPase) をコードする遺伝子の中では *ocpA, ocpO* が PrtR によって正に制御されていることが示唆された。一方、アスパルティックエンドペプチダーゼ (APase) をコードする遺伝子のうち *pepO* は培養時間依存的に PrtR により転写が促進されていることが示された。これに対してジペプチジルペプチダーゼ遺伝子などは PrtR の制御下にないことが示唆された。

酸性側で働くペプチダーゼについて転写と活性の相関を見るために、大豆タンパク質を窒素源とした培地で Δ*prtR* 株を培養し、培養上清中のペプチダーゼ活性の測定を行った。Z-Glu-Tyr を基質とした CPase 活性測定では、コントロール株における約 65~75% の CPase 活性が、PrtR の制御下にある遺伝子にコードされる OcpO に依存するものであることが示唆された。pH 3.0 のカゼインを基質としたエンド型ペプチダーゼ活性測定では、コントロール株における約 80 % のカゼイン分解活性が、PrtR の制御下にある遺伝子にコードされる PepO に依存するものであることが示された。

Aspergillus oryzae PrtR is an ortholog of PrtT in *Aspergillus niger,* and the protein has been supposed to regulate the transcription of broad-ranging secreted peptidase genes. In this study, we created a PrtR-deficient *A. oryzae* strain to identify the genes transcriptionally controlled by PrtR.

Firstly, Δ*prtR* strains were cultured in CD-casein liquid medium for transcription analysis of peptidase genes. The results suggested that transcription level of *ocpA, ocpO* (coding serin type carboxyl peptidases) and *pepO* (coding aspartic endopeptidase) were positively controlled by PrtR.

Then, Δ*prtR* strains were cultured in CD-soy protein liquid medium to investigate the correlation between transcription level of the peptidase genes and activity of encoded acidic peptidases. The results suggested that a significant amount of the activity in culture broth of the control strain was dependent on the enzymes encoded by the genes, *ocpO* and *pepO*, whose transcription is positively controlled by PrtR.

Aspergillus oryzae, transcription factor, extracellular peptidases

講演番号：4C03-07
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:00～ ミーティングルーム C

土壌細菌 *Burkholderia multivorans* における転写制御因子 IscR の解析

Analysis of Transcriptional activation involved in iron-sulfur cluster biogenesis operon in *Burkholderia multivorans*

○野々山 翔太[1]、岸田 康平[2]、酒井 啓一郎[1]、永田 裕二[1]、津田 雅孝[1]、大坪 嘉行[1] ([1]東北大院生命科学、[2]テキサス大学マクガバンメディカルスクール)

○ Shouta NONOYAMA[1], Kouhei KISHIDA[2], Keiichiro SAKAI[1], Yuji NAGATA[1], Masataka TSUDA[1], Yoshiyuki OHTSUBO[1] ([1]Tohoku Univ., [2]Texas Univ.)

鉄硫黄クラスターは様々なタンパク質のコファクターとして利用され、本クラスターを含んだタンパク質は多種多様な代謝や遺伝子の発現制御等の重要な役割を担っている。我々は多種多様な芳香族系化合物分解能を示す土壌細菌 *Burkholderia multivorans* ATCC 17616 株(以下 ATCC 17616 株)をモデルとして、鉄硫黄クラスター生合成オペロン(*isc* オペロン)の転写制御機構の解析を行い、ATCC 17616 株の転写制御因子 IscR がその *isc* オペロンに対して果たす役割は既知とは異なる新規なものであることが示唆された。そこで、本研究では鉄硫黄クラスターと結合していない ATCC 17616 株 IscR の機能解明を目的とした解析を行った。まず、*isc* オペロンの鉄濃度に対する応答を qRT-PCR 解析で検討した結果、鉄濃度減少時、isc オペロンの転写量は増加し、この転写変動に IscR の関与が示唆された。次に、推定鉄・硫黄クラスター結合アミノ酸残基の３つのシステイン残基をアラニンに置換した IscR 誘導体(IscR-3CA)をコードする変異 *iscR* 遺伝子作製し、*iscR* 欠失株で発現させたところ、*iscS* 転写量が野生株と比較して増加した。これらの結果から、鉄硫黄クラスターと結合していない IscR が自身のプロモーターを活性化すると示唆された。この転写活性化への IscR の直接的に関与するか検討するために、精製した IscR 並びに IscR-3CA タンパク質を用いた In vitro transcription assay (IVTA)を行った。その結果、両タンパク質ともに *isc* オペロン上流プロモーターを活性化することが明らかになった。すなわち、本株の IscR は、鉄硫黄クラスターと結合していない時に自身のプロモーターを直接的に活性化することが示唆された。

Iron-sulfur (Fe-S) clusters are essential cofactors for many metabolic pathways, and Fe-S cluster-containing proteins regulate the expression of various important genes. *Burkholderia multivorans* ATCC 17616 is well recognized to exhibit extraordinary metabolic versatility. This strain is relies on the ISC system for the biogenesis of Fe-S clusters, and that the biogenesis genes are organized as an *isc* operon, whose first gene encodes IscR, a transcriptional regulatory Fe-S protein.

Transcription of the *isc* operon was activated under iron-limiting conditions by using qRT-PCR. Further analysis using an *iscR* deletion mutant in combination with a constitutive expression system of IscR and its derivatives indicated transcriptional activation of *isc* operon by Fe-S cluster-nonligated forms of IscR, through their binding to the sequences within an *isc* promoter. The results obtained in this study revealed a unique regulatory system for the expression of the ATCC 17616 *isc* operon that has not been observed in other genera.

Iron-sulfur cluster, Transcriptional regulation

講演番号：4C03-08
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:00～ ミーティングルーム C

大腸菌とサルモネラの *glnA* 3´ UTR による SucA の転写後調節

Post-transcriptional regulation of SucA by *glnA* 3´UTR in E. coli and *Salmonella*

○宮腰 昌利（筑波大医）
○Masatoshi MIYAKOSHI (Univ. Tsukuba)

バクテリアの転写後調節因子として知られている small RNA（sRNA）は相補配列を用いて標的 RNA と塩基対を形成して翻訳効率もしくは mRNA の安定性を制御する。一部の mRNA の 3´末端も従来の sRNA と同様に転写後調節因子として機能することが明らかになってきた。大腸菌やサルモネラのグルタミン合成酵素遺伝子 *glnA* mRNA は 3'UTR から sRNA GlnZ をプロセシングする。ノーザンブロット解析の結果、GlnZ は窒素源飢餓によって誘導され、RNase E の作用によってプロセシングされることが明らかになった。GlnZ に保存されている塩基と相補的な塩基配列を持つ mRNA を複数種の腸内細菌科細菌ゲノムから探索したところ、2-オキソグルタル酸デカルボキシラーゼをコードする *sucA* mRNA の 5'UTR と塩基対を形成することが予想された。GFP 翻訳融合体を用いたレポーター解析から、GlnZ が実際に塩基対形成によって *sucA* の発現を抑制することが明らかになった。また、ウェスタンブロット解析の結果、大腸菌 *glnZ* 破壊株は窒素源飢餓時に SucA の抑制が有意に緩和されることが示された。

Bacterial small RNA (sRNA) regulates its target RNAs at post-transcriptional level mainly through base-pairing mechanism. It emerged that some mRNA 3´UTRs functions as post-transcriptional regulators as well. In *E. coli* and *Salmonella*, *glnA* mRNA encoding glutamine synthetase generates GlnZ sRNA from its 3´UTR. Northern blot analysis shows that GlnZ is induced in nitrogen limitation and is processed by RNase E. Reporter analysis reveals that GlnZ has a conserved seed sequence to interact with 5'UTR of *sucA* mRNA encoding 2-oxoglutarate decarboxylase. Western blot analysis indicates that expression of SucA is repressed in nitrogen limitation and the repression is alleviated by *glnZ* disruption in *E. coli*.

small RNA, E. coli, Salmonella

発表責任者：宮腰昌利（mmiyakoshi@md.tsukuba.ac.jp）

講演番号：4C03-09
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:00～ ミーティングルーム C

Komagataella phaffii Snf1 のメタノール誘導性遺伝子発現における役割

Role of *Komagataella phaffii* Snf1 in the regulation of methanol-induced gene expression

○岡本 大樹、井上 紘一、由里本 博也、阪井 康能（京大院農）
○Taiju Okamoto, Koichi Inoue, Hiroya Yurimoto, Yasuyoshi Sakai (Kyoto Univ.)

Snf1 (AMPK: AMP-activated protein kinase) は真核生物において高度に保存されたセリン/スレオニンキナーゼであり、シグナル伝達の上流因子として、下流因子のリン酸化を介して遺伝子発現を制御する。*Saccharomyces cerevisiae* では、Snf1 は非発酵性炭素源の代謝に関わる遺伝子発現を制御する。

メタノール資化性酵母 *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*)のメタノール誘導性遺伝子発現は、転写因子 Mxr1 によって制御され、メタノールに依存しない脱抑制と、転写因子 Mit1, Trm1, Hap 複合体により制御されメタノール濃度に依存するメタノール誘導の 2 段階の活性化制御を受け、Snf1 はこのうち脱抑制に関与することが推測された。そこで本研究では、*K. phaffii SNF1* (*KpSNF1*) の遺伝子破壊を行い、各種炭素源への生育やメタノール誘導性遺伝子発現への影響を調べた。

Kpsnf1Δ 株では、メタノールを単一炭素源とする培地で生育することができず、メタノール代謝に必要なアルコールオキシダーゼ遺伝子 *AOX1*、ジヒドロキシアセトンシンターゼ *DAS* の転写レベルが大幅に低下していた。さらに、*DAS2* プロモーター支配下に蛍光タンパク質 VENUS を発現する細胞を用い、脱抑制とメタノール誘導の遺伝子発現レベルを区別して評価できるフローサイトメトリー解析を行い、*Kpsnf1Δ* 株では脱抑制もメタノール誘導も起こらなくなっていることが明らかとなった。これらの結果から、KpSnf1 が脱抑制の段階で重要な役割を果たすと考えられた。現在、Snf1 を介してメタノールシグナルが伝達される分子機構をより詳細に調べるため、Snf1 や Snf1 下流因子の 1 つと推測される Mxr1 のリン酸化動態の解析を行っている。

Snf1 (AMPK) is a Ser/Thr protein kinase highly conserved in eukaryotes and regulates transcription of a large set of genes. Methylotrophic yeast *K. phaffii (P. pastoris)* has strong and tightly regulated methanol-induced promoters. These promoters were regulated by two-step activation mechanism: derepression and methanol induction, and we have speculated that Snf1 is involved in the derepression step. In this study, we revealed that *Kpsnf1Δ* strain could not grow on methanol as a carbon source and the transcript levels of *AOX1* and *DAS* were significantly decreased. Furthermore, we found that the *DAS2* promoter was not activated at both derepression and methanol induction steps by flowcytometric analyses. These results suggest that KpSnf1 plays an important role in derepression step of methanol-induced gene expression. Now we are investigating the phosphorylation status of Snf1 and its putative downstream factor, Mxr1.

Komagataella phaffii, Snf1, methylotrophic yeast

講演番号：4C03-10
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:00～ ミーティングルーム C

放線菌 *Streptomyces coelicolor* A3(2)におけるヘムを基盤とした NO 依存性二成分制御系による抗生物質生産調節メカニズム

Heme-based NO-dependent two component system regulates the antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2)

○本間 颯太、伊藤 晋作、矢嶋 俊介、佐々木 康幸（東農大院農）
○Sota HONMA, Shinsaku ITO, Shunsuke YAZIMA, Yasuyuki SASAKI (Tokyo Univ. Agric.)

我々は放線菌 *Streptomyces coelicolor* A3(2)（*S. coelicolor*)において硝酸、亜硝酸、一酸化窒素(NO)が生産され順次循環する窒素酸化物代謝サイクルを見出した。本代謝サイクルから生産された NO は二次代謝におけるシグナル分子である事が示唆された。一方、本菌において NO を感知するヘム含有型センサータンパク質とそのレスポンスレギュレーターから成る二成分制御系が明らかとなっている。二成分制御系の欠損は抗生物質生産の有意な減少をもたらすが、内在的に生産される NO と NO 依存性二成分制御系が協調して抗生物質生産を調節するかは不明である。そこで、我々はそれらの解明を目的とした。

NO 発生剤の添加は抗生物質生産に影響を与えたが、レスポンスレギュレーター欠損株では変化がなく低いままであった。また、ゲルシフトアッセイ、ChIP-qPCR を用いた相互作用解析の結果から、レスポンスレギュレーターは抗生物質生産促進遺伝子のプロモーター領域に結合する事が明らかになった。更なる解析により、その相互作用は、細胞内 NO 濃度に依存的である事が示唆された。

以上の結果は、本菌において内在的に生産される NO が、ヘム含有型二成分制御系を介して抗生物質生産を制御する事を示唆した。

We found a nitric oxide (NO) formation cycle consisting of three nitrogen oxides, nitrate, nitrite and NO in *Strptomyces coelicolor* A3(2) (*S. coelicolor*). We further suggested that endogenously produced NO is a signaling molecule for secondary metabolism in this bacteria. Moreover, we found an NO dependent heme-based two component system (TCS) in *S. coelicolor*. While deletion of the genes encoding TCS caused a significant decrease in antibiotic production, it is unclear whether the endogenously produced NO and the NO-dependent TCS coordinate to regulate antibiotic production.

Although NO generators affected on antibiotic production, TCS defect mutants showed little changes and kept at low levels. In addition, an electrophoretic mobility shift assay (EMSA) and a chromatin immunoprecipitation-qPCR (ChIP-qPCR) experiments revealed that the response regulator binds to the promoter region of the gene encoding a pathway-specific transcriptional factor for antibiotic synthesis genes. Further analysis suggested that the interaction was dependent on intracellular NO concentration. These results suggested that endogenously produced NO regulates secondary metabolism via the heme-based TCS in *S. coelicolor.*

nitric oxide, secondary metabolism, Actinobacteria

講演番号：4C03-11
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:00～ ミーティングルーム C

RNA-seq 解析に基づいた複合培養における二次代謝活性化機構の解析

RNA-seq based analysis of mechanism responsible for activation of secondaty metabolism in combined-culture

○木田 優士、浅水 俊平、尾仲 宏康（東大院・農生科）
○Masashi KIDA, Shumpei ASAMIZU, Hiroyasu ONAKA (Univ. of Tokyo)

Streptomyces lividans TK23 とミコール酸含有細菌 *Tsukamurella pulmonis* TP-B0596(Tp)を複合培養すると、色素性抗生物質 undecylprodigiosin(RED)を始めとする二次代謝産物の生産が活性化される。複合培養での RED 生産活性化の条件として、両者の細胞同士の接触が必要であることが示唆され、ユニークな細菌間相互作用に注目し研究を行った。*Streptomyces coelicolor* JCM4020 株(Sc)と Tp との複合培養時の RNA-seq 解析により推定された制御機構について更なる解析を行った。Tp との複合培養では Sc のリン酸飢餓応答系に関与する PhoP レギュロンが活性化された。培養液中の実際のリン酸濃度を経時的に測定したところ、*Streptomyces lividans* TK23 と Tp との複合培養において培養開始 12 時間でリン酸濃度が 0.1 mM 以下となりリン酸飢餓状態となることが明らかとなった。そこでリン酸濃度の影響を調べるために、複合培養にリン酸を 2.87mM 添加したところ、RED 生産は誘導されなかった。以上の結果、接触を介した刺激と同時にリン酸飢餓状態であることが RED の誘導生産に必要な条件であることが強く示唆された。

Streptomyces lividans TK23 activates the production of secondary metabolites including the pigmented antibiotic undecylprodigiosin(RED) in combined-culture with mycolic acid-containing bacteria *Tsukamurella pulmonis* TP-B0596(Tp). It was suggested that cell-to-cell contact is responsible for activation of RED production in combined-culture. The possible regulatory mechanism was suggested by RNA-seq analysis during combined-culture of *Streptomyces coelicolor* JCM4020(Sc) and Tp, and it was further analyzed. Sc activated the PhoP regulon which is involved in the response to phosphate(P_i) starvation in combined-culture. The P_i concentration in the culture medium was measured and it was found that P_i was consumed and became less than 0.1 mM in combined-culture indicating phosphate starvation. To further investigate the effect of P_i, 2.87 mM of P_i was added to the combined-culture and it was found that RED production was not induced in this condition. These results suggested that P_i starvation is necessary for the activation of RED production by Sc in addition to the contact-mediated stimulation.

Streptomyces, Co-culture, Phosphate starvation

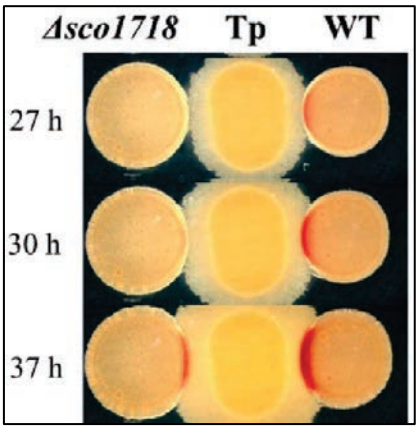
講演番号：4C03-12
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:00～ ミーティングルーム C

複合培養における *Streptomyces coelicolor* の RED 生産遅延に関与する TetR 型転写制御因子の解析

Analysis of *Streptomyces coelicolor* TetR family transcriptional regulator involved in RED production delay phenotype during combined-culture

○LEI YUKUN[1]、浅水 俊平[1]、石塚 匠[1]、栁澤 昌臣[1]、大野 豊[2]、佐藤 勝也[2]、尾仲 宏康[1]([1]東大農、[2]量研機構)

○Yukun LEI[1], shumpei Asamizu[1], Takumi Ishiduka[1], Masaomi Yanagisawa[1], Yutaka Ono[2], Katsuya Sato[2], Hiroyasu Onaka[1] ([1]Tokyo Univ., [2]QST)



放線菌 *Streptomyces coelicolor* JCM4020 はミコール酸含有細菌（MACB）*Tsukamurella pulmonis* TP-B0596 との複合培養において、接触を介した刺激に応答し、赤色抗生物質 undecylprodigiosin（RED）の生産を活性化する。この応答の分子機構を解明するために、順遺伝学的手法を用いて研究を行った。炭素イオンビーム照射により作製した変異株ライブラリーから RED 生産応答性が変化した変異株スクリーニングを行い、ゲノムリシーケンス解析を行った。その結果、RED 生産応答性が遅延した変異株のうち、TetR ファミリー転写制御因子 *sco1718* ホモログがその原因遺伝子となった株が存在した。

組換え SCO1718 を用いた EMSA により、SCO1718 がその 5'UTR に結合し、近接する ABC トランスポーター遺伝子の発現を抑制することが示唆された。ABC トランスポーターは薬剤排出ポンプであると予想し、*sco1718* 破壊株の種々の抗生物質に対する耐性を評価したところ、リンコマイシン、バンコマイシンなどに対し耐性を示した。上記抗生物質に曝された WT は RED 生産が誘導されたが、これらの抗生物質は SCO1718 のリガンドとはならなかった。以上の結果から、複合培養では ABC トランスポーターによって排出される内在性の低分子の蓄積がストレスとなり RED 生産の一因となることが予想された。現在、真のリガンド探索を始めとする更なる解析を行っている。

S. coelicolor JCM4020 activates the production of red-colored antibiotic undecylprodigiosin (RED) in response to the stimulation of physical contact with mycolic acid-containing bacteria *T. pulmonis* TP-B0596 during combined-culture. To elucidate the molecular mechanism of this metabolic response, random mutant library generated with $^{12}C^{5+}$ heavy ion beam irradiation was used to screen for change in the RED production, and the genome of mutants with phenotype change were re-sequenced. Homologue of TetR family transcription factor *sco1718* was found to be responsible for delayed RED production in the mutant.

Here we report the in vivo and in vitro characterization of *sco1718*. In brief, it represses the expression of an adjacent ABC transporter, which pumps out certain endogenous small molecule. The accumulation of this small molecule probably becomes metabolic stress and leads to RED production during combined-culture.

co-culture, *Streptomyces*, transcriptional regulator

講演番号：4C03-13
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:00～ ミーティングルーム C

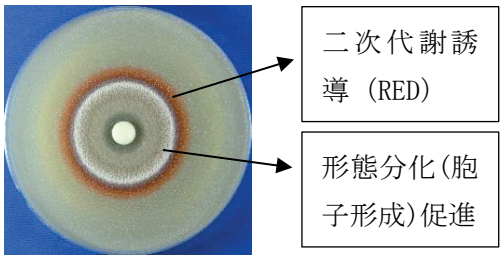
ゴードスポリンが *Streptomyces lividans* の生産するタンパク質及び生育、二次代謝に与える影響

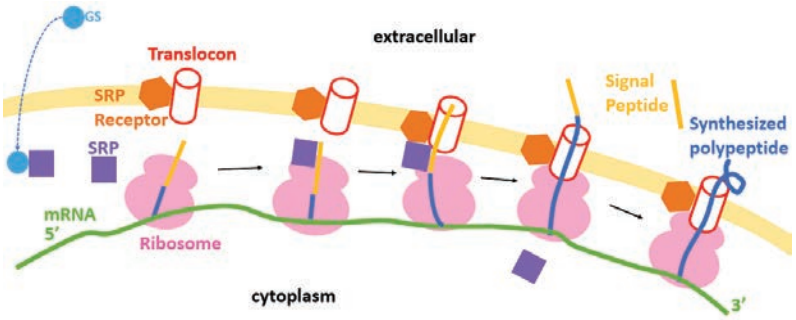
Goadsporin effects on the growth, secondary metabolism, and protein expressions in *Streptomyces lividans*

○河野 佐知子、浅水 俊平、尾仲 宏康（東大院農生科）
○Sachiko KAWANO, Shumpei ASAMIZU, Hiroyasu ONAKA (Univ. of Tokyo)

Streptomyces sp. TP-A0584 から発見されたリボソーム翻訳型ペプチド goadsporin（GS）は、広範囲の放線菌に対して高濃度で生育阻害、低濃度で二次代謝及び胞子形成促進作用を示す。GS は分泌タンパク質の局在化に関わるシグナル認識粒子（SRP）の主要因子である Ffh に結合し、その作用を阻害することが実験的に強く示唆されている。SRP を標的とする阻害剤はこれまでに報告がないことから、放線菌への GS の二次代謝の誘導効果に注目し、更なる解析を行った。

本研究では、*Streptomyces lividans* TK23 を用いて、液体培地での生育及び二次代謝産物生産に GS の添加が与える影響を評価した。その結果、液体培地においては 8 μg/mL の濃度で顕著に undecylprodigiosin(RED)及び actinorhodin(ACT)の生産を活性化することが明らかになった。また、GS は SRP 機構を阻害すると推定されたことから、培養液上清中の分泌タンパク質を解析し、変化が見られたタンパク質を同定した。現在、変動したタンパク質と表現型（二次代謝および胞子形成）の関連についてさらに解析を行っている。





左：GS の作用、右：SRP 機能の模式図

Goadsporin (GS) is a ribosomally synthesized and post-translationally modified peptides which was isolated from *Streptomyces* sp. TP-A0584. GS not only inhibits growth but also promotes secondary metabolism and morphological differentiation in sublethal concentration against a broad range of actinomycetes. The molecular target of GS is indicated to be Ffh, a major component of SRP. SRP is essential factor for nascent protein localization, therefore we predicted that inhibition of SRP by GS is responsible for the observed phenotype.

Effect of GS on RED and ACT production was evaluated using *Streptomyces lividans* TK23 in liquid medium, and variation of secreted proteins were also analyzed. Currently, relation between varied proteome and observed phenotypes is under investigation.

antibiotic production, chemical communication, actinomycetes

講演番号：4C03-14
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:00～ ミーティングルーム C

放線菌 *Streptomyces lavendulae* FRI-5 株由来休眠遺伝子の強制発現による 新規化合物の発掘

Discovery of new compounds by activation of silent biosynthetic genes from *Streptomyces lavendulae* FRI-5

○池阪 昂平、小椋 康平、Ivy Grace Umadhay Pait、本田 孝祐、仁平 卓也、木谷 茂（阪大・生物工学国際交流センター）
○Kohei Ikesaka, Kohei Ogura, Ivy Grace Umadhay Pait, Kohsuke Honda, Takuya Nihira, Shigeru Kitani (International Center For Biotechnology, Osaka University)

放線菌には、多数の休眠二次代謝生合成遺伝子クラスターが存在する。これら休眠遺伝子群の活性化は、新規化合物の取得につながると期待される。私たちは、放線菌 *Streptomyces lavendulae* FRI-5 株から休眠状態の PKS 遺伝子（*lav*）クラスターを見出し、*Streptomyces avermitilis* SUKA22 株にて異種発現させた結果、新規物質ラベンジオールを発見した（Pait *et al. J Ind Microbiol Biotechnol.* 2018）。しかし、*lav* クラスターには多数の修飾酵素遺伝子が含まれるため、ラベンジオールが真の産物ではない可能性を考えた。①*lav* クラスターを異なる放線菌宿主株に導入する、②*lav* クラスター内の SARP 型転写制御因子を *S. lavendulae* FRI-5 株にて強制発現する、ことにより、*lav* クラスターが合成する化合物の解明を目指した。*lav* クラスターを *Streptomyces coelicolor* A3(2) M1152 株に導入したところ、新たに化合物 **1** と **2** が生産された。**1** と **2** は、ラベンジオールの C10 位-C11 位間の二重結合が酸化された新規化合物（ラベンテトラオール A／B）であった。一方、*S. lavendulae* FRI-5 株にて *lav* クラスターを覚醒させるため、SARP 型転写制御因子をコードする *lavR* 遺伝子の過剰発現を試みた。その結果、ラベンテトラオール A/B と推定される化合物に加え、新たな化合物 **3** が生産された。**3** が *lav* クラスターにコードされる化合物であるかを検証するため、現在、その構造同定を進めている。

Actinomycetes have a large number of silent biosynthetic gene clusters. Activation of these genes could provide us novel useful compounds. We have previously identified a silent PKS (*lav*) gene cluster from *Streptomyces lavendulae* FRI-5. *Streptomyces avermitilis* SUKA22 harboring the *lav* cluster produces novel polyketide compound named lavendiol (Pait *et al*. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2018). However, the *lav* cluster has many putative tailoring enzymatic genes for polyketide compounds. In this study, we approached two ways for identification of a true *lav* product, such as heterologous expression of the *lav* cluster and overexpression of a putative regulatory gene located in the *lav* cluster. When the *lav* cluster was introduced into *Streptomyces coelicolor* A3(2) M1152, the engineered strain produced compounds **1** and **2**. The spectroscopic analyses of **1** and **2** demonstrated that both compounds (named laventetraol A/B) are a derivative of lavendiol. Meanwhile we found that the *lav* cluster contains *lavR*, a SARP-family regulator gene, the product of which probably functions as a transcriptional activator. To active the *lav* cluster transcriptionally, we introduced the *lavR* gene into *S. lavendulae* FRI-5 as an additional copy. HPLC analysis demonstrated that compound **3** as well as laventetraol A/B were detected in the culture broth of the *S. lavendulae* harboring the additional *lavR* gene.

Streptomyces, Polyketide, Heterologous expression

発表責任者：池阪昂平（kohei_ikesaka@icb.osaka-u.ac.jp）

講演番号：4C03-15
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:00～ ミーティングルーム C

オフロキサシンを活用した放線菌の二次代謝活性化

Combined genetic and physiological effects of ofloxacin can activate secondary metabolism in actinomycetes

○星野 颯[1,2]、谷津 穂高[3]、濱渦 亮子[1]、保坂 毅[1,2,3] ([1]信州大・バイオメディカル研、[2]信州大・総合医理工、[3]信州大・農)
○Kanata HOSHINO[1,2], Hotaka YATSU[3], Ryoko HAMAUZU[1], Takeshi HOSAKA[1,2,3] ([1]IBS-ICCER, Shinshu Univ., [2]Grad. Sch. of Med. Sci. and Technol. Shinshu Univ., [3]Fac. of Agric. Shinshu Univ.)

オフロキサシン（OF）は，細菌の II 型トポイソメラーゼに作用し，DNA 複製を阻害するニューキノロン系抗生物質である。我々はこれまでに，放線菌基準菌株 *Streptomyces coelicolor* A3(2)から取得した OF 耐性変異株が，抗生物質を高生産することを見出している。本研究ではこの現象の検証とメカニズムの解明を目的とした。

Streptomyces vietnamensis NBRC 104153 を含む 5 種類の放線菌から取得した OF 耐性変異株において，抗生物質高生産化が認められた。OF 存在下で抗生物質生産が劇的に向上する変異株も存在した。興味深いことに，*Streptomyces lividans* 66 では，OF 存在下で 56%（70 株/125 株）の OF 耐性変異株が抗生物質を高生産した。以上の結果は，OF の遺伝学的作用と生理学的作用を組み合わせると，放線菌の二次代謝を効率的かつ劇的に活性化できることを示唆した。現在，メカニズムの解明に向け，OF 耐性変異を探索している。

Ofloxacin (OF) is a representative fluoroquinolone that directly inhibits bacterial DNA synthesis by binding to type II topoisomerase. In a previous study, we found that OF-resistant (OF^r) mutants isolated from the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2) often overproduce antibiotics. The aim of this study is to verify this phenomenon and to elucidate underlying mechanism.

Antibiotic-overproducing OF^r mutants were newly isolated from five different kinds of *Streptomyces* strains, including *Streptomyces vietnamensis* NBRC 104153. OF^r mutants that could overproduce antibiotics in the presence of OF were also isolated from some of these *Streptomyces* strains. Interestingly, 56% of OF^r mutants isolated from *Streptomyces lividans* 66 exhibited increased antibiotic production in the presence of OF. These findings suggest that combined genetic and physiological effects of OF can efficiently activate secondary metabolism in actinomycetes. We intend to conduct further investigations to understand the underlying mechanisms by identifying the mutated genes.

Ofloxacin, Actinomycetes, Antibiotic overproduciton

発表責任者：保坂毅（thosaka@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：4C03-16
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:00～ ミーティングルーム C

糸状菌リボソームペプチド前駆体ペプチドにおける繰り返し構造の役割

Role of tandem repeat structure in precursor peptide of fungal ribosomal peptides

○梅村 舞子[1]、栗岩 薫[1]、玉野 孝一[1,2]、河原林 裕[1] ([1]産業技術総合研究所生物プロセス研究部門、[2]産業技術総合研究所生体システムビッグデータ解析オープンイノベーションラボラトリ)
○ Maiko Umemura[1], Kaoru Kuriiwa[1], Koichi Tamano[1,2], Yutaka Kawarabayasi[1] ([1]National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), [2]CBBD-OIL, AIST)

糸状菌は多くの中分子環状ペプチドを産生するが、これまで知られていたものはすべて非リボソームペプチド生合成酵素によるものであった。しかし近年、非リボソームペプチド生合成経路とは全く異なる、化合物の骨格構造が前駆体ペプチド遺伝子に直接書き込まれたribosomally synthesized and post-translationally modified peptides (RiPPs) 生合成経路の新しいクラスが、Aspergillus 属において見出された [1,2]。Aspergillus 属だけでなく Fungi 界全体に広く多様に保存される本生合成クラス [3] は、前駆体ペプチドにおいて、化合物骨格構造を含むコアペプチドが時には 16 回と高い繰り返し構造を有する。しかしなぜ遺伝子を維持する上で不安定と考えられる高い繰り返し構造が広く保存されているのかは不明である。本研究では、本経路クラスの最初の例である ustiloxin 生合成経路において、コアペプチドの配列と繰り返し回数を改変し、化合物生産性に与える影響を調べた。その結果、コアペプチド配列は本生合成環化因子等に最適化されていること [4]、繰り返し回数の 1 からの増加とともに化合物生産性が向上するが、天然繰り返し回数 16 回の半分程度をピークとして減少すること、15 個の遺伝子からなる生合成経路全体の発現を強化した株ではそのピークが天然繰り返し回数に近付くことが分かった。これらのことから、本経路群における前駆体ペプチドの高い繰り返し構造は、化合物の生産性向上に寄与する一方で、生合成経路以外に化合物生産性を制御する因子の存在が示唆された。

Ustiloxin is a cyclic peptide as the first example of RiPPs in Ascomycetes [1]. Its precursor peptide contains the highly-repeated core-peptide sequence of the compound backbone structure. It is unknown why such a highly-repeated structure has been conserved in a gene in spite of the disadvantage against genome maintenance. Here, we mutated the precursor peptide gene to change the core peptide sequence and the repetitive number, and observed the influence on compound productivity. The results suggested that the core peptide sequence is well optimized to the biosynthetic machinery [4] and the repetitive structure contributes to increasing the compound productivity, but other factors can also control the compound productivity.

[1] Umemura et al., *Fungal Genet. Biol.*, 68:23-30, 2014, [2] Nagano, Umemura et al., *Fungal Genet. Biol.*, 86:58-70, 2016, [3] Umemura, *Fungal Biol. Biotechnol.*, 7:11, 2020. [4] Umemura et al., *Fungal Genet. Biol.*, 143:103434, 2020.

Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptides (RiPPs), tandem repeat structure, cyclic peptide

発表責任者：梅村舞子（umemura-m@aist.go.jp）

講演番号：4D02-01
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:30～ ミーティングルーム D

ゴマ由来アンジオテンシン I 変換酵素（ACE I）阻害ペプチドの探索および機能解析

Isolation and characterization of ACE I-inhibitory peptides from sesame

○野村 亮[1]、都築 翔[1]、寺西 弘志[2]、山本 正次[2]、上前 健太朗[2]、志水 元亨[1]、加藤 雅士[1]（[1]名城大農、[2]KISCO 株式会社）
○ Ryo NOMURA[1], Sho TSUDUKI[1], Hiroshi TERANISHI[2], Masaji YAMAMOTO[2], Kentaro KAMIMAE[2], Motoyuki SHIMIZU[1], Masashi KATO[1] ([1]Meijo Univ., [2]KISCO Ltd.)

高血圧症は脳血管疾患および心血管疾患の要因となる慢性疾患であり、世界的に死亡率増加の大きな要因となっている。血圧調整システムであるレニンアンジオテンシン系では、アンジオテンシン I 変換酵素（ACE I）によって、アンジオテンシン I が血管収縮活性を持つアンジオテンシン II に変換される。したがって、ACE I 活性を阻害することで血圧の上昇を抑制することが可能である。近年、食品等に含まれるタンパク質由来のペプチドが ACE I 活性を阻害することが明らかになっており、関心が高まっている。ゴマは様々な機能性食品の原料として利用されている。ゴマ油を製造する際、ゴマを圧搾し、濾過した後にできる残渣には、タンパク質が多く含まれている。それらをプロテアーゼ等で分解することで生成するペプチドには ACE I 活性を阻害するものが含まれていることが知られている。本研究では、ゴマの主要タンパク質の加水分解物に由来する ACE I 阻害活性を持つペプチドを検索することを目的とした。ゴマに含まれるタンパク質を解析したところ、11S globulin seed storage protein 2 (11SG) が主要なタンパク質であった。さらに、11SG のサーモリシンでの加水分解で生成することが予想されるペプチドについて、ゴマタンパク質残渣の加水分解産物中の含有量を網羅的に解析・定量した。それらの中で含有量が多かった 17 種のペプチドを合成し ACE I 阻害活性を測定したところ、ペプチド ILKY, VIRAMP, FNVPQET, IVAIPSG, LIVM, IFSRQ は高い ACE I 阻害活性（IC_{50} = 13 - 58 μM）を有していた。以上、ゴマタンパク質残渣の加水分解産物に由来する血圧調整機能を有するペプチドを新規に多数発見することに成功した。

Hypertension, high blood pressure, is a chronic disease that contributes to cerebrovascular and cardiovascular disease. The renin-angiotensin system is a major regulatory system for blood pressure, angiotensin I-converting enzyme (ACE I) converts the angiotensin I to angiotensin II, which has vasoconstrictive activity. Inhibition of ACE I activity can prevent the elevation of blood pressure. Recently, there is increasing interest in natural bioactive ingredients such as protein-derived ACE I-inhibitory peptides.Sesame is used as a source of an ingredient in various functional foods. In this study, we determined the ACE I-inhibitory activity of the peptides derived from 11S globulin seed storage protein 2 (11SG), a major sesame seed protein. The peptides ILKY, VIRAMP, FNVPQET, IVAIPSG, LIVM, and IFSRQ, which were produced by the thermolysin digestion, possessed high ACE I inhibitory activity (IC_{50} = 13 - 58 μM).

ACE-inhibitory peptides, 11S globulin seed storage protein 2, Thermolysin

講演番号：4D02-02
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:30～ ミーティングルーム D

アサイー果実抽出物は腎低酸素化を介して造血因子 erythropoietin を増加する

Acai extract transiently upregulates erythropoietin by inducing a renal hypoxic condition in mice

○澁谷 修一[1]、戸田 年彦[2]、渡辺 憲史[1]、Jose Villegas Yata Mario[3]、清水 孝彦[1,2] ([1]国立長寿医療研究セ・老化ストレス応答、[2]千葉大院医・内分泌代謝・血液・老年内科学、[3]株式会社フルッタフルッタ)

○Shuichi Shibuya[1], Toshihiko Toda[2], Kenji Watanabe[1], Mario Jose Villegas Yata[3], Takahiko Shimizu[1,2] ([1]Aging Stress Response Research Project Team, National Center for Geriatrics and Gerontology, [2]Chiba Univ. Dept of Endocrinol., Hematol. and Gelontol., [3]FRUTA FRUTA, Inc.)

アサイー(*Euterpe oleracea* Mart. Palmae, Arecaceae)はブラジルのアマゾン地方原産の果実で、パラ州では健康増進の目的で常用されている。アサイー果実抽出物はポリフェノール、鉄、ビタミン E、および不飽和脂肪酸を多く含み、種々の機能性が報告されている。アサイー抽出物を野生型マウスに 4 日間経口投与し(10 g/kg/day)、各血液パラメータを調べたところ、アサイー投与は有意に赤血球、ヘモグロビン、およびヘマトクリット量を増加させた。さらに、造血因子の発現を調べたところ、アサイー果実抽出物投与により有意に低酸素応答性造血因子 erythropoietin (EPO) が血中で増加し、腎臓での *Epo* 遺伝子発現も増加した。さらに、EPO 増加と腎臓の低酸素化の関連を調べるために、アサイー抽出物を単回経口投与し(10 g/kg)、2 時間後に腎臓の酸素レベルを低酸素プローブ pimonidazol で組織学的に解析した。その結果、アサイーを投与した腎臓は pimonidazol の染色性が増加し、低酸素化を呈していた。以上の結果から、アサイー果実抽出物は腎臓の低酸素状態を惹起して EPO 発現を増加させることが明らかとなった。

Acai (*Euterpe oleracea* Mart. Palmae, Arecaceae) is a palm plant native to the Brazilian Amazon. It contains many nutrients, such as polyphenols, iron, vitamin E, and unsaturated fatty acids, so in recent years, many of the antioxidant and anti-inflammatory effects of acai have been reported. However, the effects of acai on hematopoiesis have not been investigated yet. In the present study, we administered acai extract to mice and evaluated its hematopoietic effects. Acai treatment significantly increased the erythrocytes, hemoglobin, and hematocrit contents compared to controls for four days. Then, we examined the hematopoietic-related markers following a single injection. Acai administration significantly increased the levels of the hematopoietic-related hormone erythropoietin in blood compared to controls and also transiently upregulated the gene expression of *Epo* in the kidney. Furthermore, in the mice treated with acai extract, the kidneys were positively stained with the hypoxic probe pimonidazole in comparison to the controls. These results demonstrated that acai increases the erythropoietin expression via hypoxic action in the kidney.

hematopoiesis, polyphenol, erythropoietin

講演番号：4D02-03
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:30～ ミーティングルーム D

ラットにおけるブラジル産グリーンプロポリス由来桂皮酸誘導体の代謝
Metabolism of cinnamic acid derivatives in Brazilian green propolis in rats.

○山家 雅之[1,2]、谷 央子[1]、室田 佳恵子[2,3]([1]株式会社山田養蜂場　みつばち健康科学研究所、[2]鳥取大学大学院連合農学研究科　生命資源科学専攻　資源利用化学講座、[3] 島根大学　生物資源科学部生命科学科)
○Masayuki YAMAGA[1,2], Hiroko TANI[1], Kaeko MUROTA[2,3] ([1]Institute for Bee Products and Health Science, Yamada Bee Company Inc., [2]Applied Bioresource Chemistry, Bioresource & Life Science, The United Graduate School of Agricultural Science, Tottori University., [3]Department of Life Sciences, Faculty of Life and Environment Life Sciences, Shimane University.)

プロポリスはミツバチが植物の新芽等から作る樹脂状の物質で、様々な有効性が報告されている。ブラジル産グリーンプロポリス（BGP）は、特徴成分としてアルテピリン C（ArtC）等の桂皮酸誘導体を含み、BGP の有効性への関与が期待されている。これまでに、BGP 摂取時の代謝をヒトで報告しているが（Yamaga et al., ICoFF2019, 論文投稿中)、BGP の有効性に対する各成分の寄与を検討する上で、成分の単独投与時の代謝を明らかにすることも重要である。そこで、本研究では BGP の主要な 4 つの桂皮酸誘導体を単独投与した際の吸収・代謝をラットで検証することを目的とした。BGP の主要な桂皮酸誘導体として ArtC、ドルパニン、バッカリン及び *p*-クマル酸を BGP の含有率に合わせた量で、Wistar/ST ラット（♂:7-8 週齢）にゾンデにて投与した。投与前及び投与後 24h までの血漿と尿を採取し、脱抱合酵素による処理前後の検体を LC/MSMS にて分析した。ArtC 投与後の血漿を分析した結果、ArtC-4-*O*-ß-D-glucuronide と遊離型の ArtC が検出された。また、ArtC のプレニル基が 1 つ脱離したドルパニン、プレニル基に水酸基が付加したカピラルテミシン A、及びそれらの抱合体が合わせて検出された。このことから BGP の生体内機能性発揮における ArtC の作用機序や寄与率を考察する際には、親化合物の ArtC だけでなく代謝物を含め有効性を検討する必要があると考えられる。その他の成分においても特徴的な代謝物が見出されたので併せて報告する。

Brazilian green propolis (BGP) has chemical compounds that are mainly cinnamic acid derivatives, such as artepillin C (ArtC). These components are expected to play an important role in the pharmacological effects of BGP. However, little is known about the metabolism of those cinnamic acid derivatives in BGP when administered as a single agent. The aim of this study is to investigate the metabolism of individual cinnamic acid derivatives of BGP in rats. Wistar/ST rats were received ArtC, drupanin, baccharin, and *p*-coumaric acid intragastrically. Plasma and urine samples were collected before and up to 24 h after administration and analyzed by LCMSMS. After ArtC administration, ArtC-4-*O*-ß-D-glucuronide and free ArtC were detected in the plasma and the urine samples. In addition, drupanin, capillartemisin A, and these conjugates were detected as metabolites of ArtC. These results suggest that ArtC as well as drupanin and capillartemisin A should be taken into account when considering the contribution of ArtC to the biological effects of BGP *in vivo*. The metabolic profiles of other components will also be discussed.

Brazilian green propolis, cinnamic acid derivatives, metabolism

発表責任者：山家雅之（my1636@yamada-bee.com）

講演番号：4D02-04
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:30～ ミーティングルーム D

安定同位体標識による 1-デオキシノジリマイシンの吸収・排泄と臓器移行の評価
Evaluation of pharmacokinetics of 1-deoxynojirimycin using stable isotope tracer analysis

○高須 蒼生[1]、パリダ イザベラ スパルディ[1]、田中 福代[2]、山岸 賢治[3]、伊藤 隼哉[1]、木村 俊之[3]、仲川 清隆[1] ([1]東北大院農・機能分子解析学、[2]農研機構中央農業研究センター、[3]農研機構食品研究部門)
○Soo TAKASU[1], Isabella S. Parida[1], Fukuyo Tanaka[2], Kenji Yamagishi[3], Junya Ito[1], Toshiyuki Kimura[3], Kiyotaka Nakagawa[1] ([1]Food and Biodynamic Chemistry Laboratory, Tohoku Univ., [2]Central Region Agricultural Research Center, NARO, [3]Food Research Institute, NARO)

【背景】1-デオキシノジリマイシン（DNJ）は、イミノ基（-NH-）を有することを特徴とするグルコースと類似した構造の化合物で、桑や一部の微生物などで生産される。DNJ は腸管でα-グルコシダーゼ活性を阻害し、糖の分解と吸収を抑制することから、糖尿病への有効性が期待される。さらに DNJ は体内へ吸収され、抗肥満作用も報告されるなど、その生理作用に大きな注目が集まっている。実際に DNJ の機能性食品などとしての利用には、生理活性に加えて安全性の十分な評価、例えば、吸収や排泄、臓器への蓄積の解明が求められている。そのような中、DNJ が代謝されるかは正確にはわかっていないため、同位体を利用したトレーサー分析のように代謝物を含めた吸収や臓器蓄積の評価が有用である。我々はこれまでに、微生物を用いて安定同位体標識した ^{15}N ラベル化 DNJ を生産、精製する方法を開発している。そこで本研究では、^{15}N ラベル化 DNJ をラットへ投与し、^{15}N のトレーサー分析による DNJ の代謝物を含めた吸収・排泄・臓器分布の詳細な解明を目指した。
【方法と結果】*Bacillus amyloliquefaciens* DSM7 を 5 日間培養後、イオン交換樹脂に供し ^{15}N ラベル化 DNJ を調製した。SD ラット（雄性、6 週齢、n = 6）を一週間予備飼育後、12 時間絶食した。水（対照群）または、^{15}N ラベル化 DNJ（高濃度：100 mg/kg B.W.、中濃度：10 mg/kg B.W.、低濃度：2 mg/kg B.W.）を経口投与し、糞尿を 3 日間回収した。その後、屠殺し臓器・組織、さらに皮膚、筋肉、骨などの全身をまとめて「と体」として回収した。全窒素量（SUMIGRAPH NCH-22）及び窒素同位対比（ANCA-GSL CN analyzer）を測定し、糞尿、臓器中の ^{15}N 量を定量した。

結果、尿からの回収率は投与量により異なり、高・中・低濃度群でそれぞれ 34、50、74%だった。DNJ は体内へ吸収後、尿から排泄されることから、DNJ の吸収率が投与量依存的に変化することが示された。また、臓器からは大群でのみ DNJ 由来の ^{15}N がわずかに検出された。糞・尿・臓器を合計すると回収率は約 80-90%と良好な値であり、本分析法の有用性が示された。本研究は、^{15}N ラベル化 DNJ を利用したトレーサー分析により、DNJ が体内へと吸収された後、3 日以内に代謝物を含め体外にすべて排出されることを初めて明らかにし、DNJ の安全性を強く示唆した。

To evaluate the safety of DNJ, its absorption, excretion and organ/tissue distribution were evaluated using ^{15}N tracer analysis following the oral administration of ^{15}N labeled DNJ. The results demonstrated that DNJ was absorbed in dose-dependent manner and almost completely excreted 72 hours after the oral intake, thus confirming its safety.

1-Deoxynojirimycin DNJ, Pharmacokinetics, Absorption

発表責任者：仲川清隆（kiyotaka.nakagawa.c1@tohoku.ac.jp）

講演番号：4D02-05
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:30～ ミーティングルーム D

レジスタントスターチ (RS2a) 摂取が便秘の訴えを有する女性の排便状態と腸内フローラに及ぼす影響

The effect of ingestion of resistant starch 2a (RS2a) on bowel habits and microbiota composition in women with a complaint of constipation

○永井 成美、久保 歩美、黒田 佳澄、末継 夏帆、鈴木 新、飯田 晃生、高山 祐美、湯面 百希奈 (兵庫県立大栄養)
○Narumi NAGAI, Ayumi KUBO, Kasumi KURODA, Kaho SUETSUGU, Arata SUZUKI, Akio IIDA, Yumi TAKAYAMA, Yukina YUMEN (Univ. Hyogo)

レジスタントスターチ（RS）は，小腸内で消化を受けず大腸に到達し，腸内細菌による発酵を受けて生じる短鎖脂肪酸を介した作用等により腸内環境改善に寄与すると考えられている。本研究では，RS の中でも難消化性の結晶構造を有する RS2a 摂取が，便秘の訴えのある女性の排便状態や腸内フローラに及ぼす影響を介入試験により検討した。対象は，ウェブで募集した 217 名のうち便秘評価尺度（J-CAS）で便秘と判定された 40 名とし，6 g/日の RS2（グリーンバナナ由来精製デンプン 10 g を粉末で摂取，スマートスターチ(株)製）を 30 日間摂取してもらい，J-CAS，ストレスチェックリスト（SCL）等の結果を前後比較した。さらに 40 名より 10 名を選び，介入前後に腸内細菌検査を行った。39 名が試験を完了し，介入後には，J-CAS と SCL スコアの有意な低下とともに，肌の調子と排便時爽快感のスコアが有意に上昇した。また，腸内細菌検査を受けた 10 名には，J-CAS スコア変化量と短鎖脂肪酸産生菌比率に有意な負の相関が認められた。単群のオープンラベル試験という限界はあるが，グリーンバナナ由来 RS2a の継続的摂取が，便秘を訴える女性の排便状態の改善やストレス緩和に寄与する可能性，および，便秘の改善において短鎖脂肪酸産生菌比率が関連する可能性が示唆された。

We aimed to investigate whether resistant starch 2a (RS2a) derived from green-banana has beneficial effects on bowel habits through improvement of intestinal environment in women with a complaint of constipation. Over 30 days, 40 participants consumed 6 g/day of RS2a and reported supplement ingestion, defecation frequency and stool form. Assessment of constipation, mental stress, skin condition, and dietary habit were conducted at 1-week interval or at baseline and end of the trial. Of 10 participants were received microbiota analysis. After 30 days, a significant decrease in score of constipation and mental stress, with improved subjective comfortable feeling during defecation and skin condition in 39 participants who completed the trial. Moreover, a significant correlation was observed between changes in constipation score and proportion of butyrate-producing bacteria. Despite some limitations, the findings suggest that 30-days ingestion of RS2a may have favorable effects on constipation and mental stress in women with constipation complaint. Additionally, butyrate-producing bacteria rate could have a potential role in normal bowel movement.

resistant starch, bowel habit, human

発表責任者：永井成美（nagai.lab.uh@gmail.com）

講演番号：4D02-06
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:30～ ミーティングルーム D

アボカド果実からのアクロレイン消去成分の精製
Purification of acrolein-scavenging compounds from avocado fruits

○酒井 杏子、田村 奈津美、真野 純一 (山口大農)
○Kyoko SAKAI, Natsumi TAMURA, Jun'ichi MANO (Yamaguchi Univ.)

細胞内で生成する活性酸素種は膜脂質をつねに酸化しており，生じた過酸化脂質（LOOH）は酵素的・非酵素的に分解されてアクロレイン（ACR）などの活性カルボニル種（RCS）となる。RCS は核酸やタンパク質に求電子的に結合してその機能を損ね，様々な疾患やがん，老化を引き起こす。RCS を消去する低分子物質は疾患の治療や予防に用いられている。本研究は，植物から新奇 RCS 消去物質を発見することを目的としている。

食品として利用される植物材料から 80%エタノール抽出液を調製し，ACR と混合したときの ACR 減少速度から RCS 消去能を評価した。比較した 58 種の植物材料ではニンニク，ホウレンソウ，ハナッコリー, アボカド, ハスが特に高い ACR 消去能を示した。これらの植物種は被子植物の系統樹上で様々な分類群に分布していることから，ACR 消去能を示す植物成分はおそらく多様であると期待できる。

ACR 消去能が高かったアボカドから RCS 消去物質の精製を行った。アボカド果肉の抽出液を ODS カラムで分画すると，ACR 消去物質は高極性画分に溶出された。これを更にアミノカラムで分画し精製を進めている。

Reactive oxygen species are constantly produced in living cells and oxidize membrane lipids. Resulting lipid peroxides are degraded to reactive carbonyls species (RCS) such as acrolein (ACR). RCS are electrophilically bound to nucleic acids and proteins to impair their functions, and can cause various diseases, cancer, and aging. Several kinds of small molecules that scavenge RCS are known, which are useful in the treatment and prevention of diseases. The purpose of this study is to discover novel RCS scavenging compounds from plant materials.

We screened 58 edible plant species for the RCS scavenging ability, which was evaluated from the ACR consumption rate of the plant extract. Several plant species showing high ACR scavenging ability belonged to various taxa of angiosperms, suggesting that plants have diverse compounds to scavenge ACR.

We will report the purification of RCS scavenging compounds from avocado fruits.

reactive electrophiles, reactive carbonyl species, reactive oxygen species

発表責任者：酒井　杏子（a013vhu@yamaguchi-u.ac.jp）

講演番号：4D02-07
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:30～ ミーティングルーム D

異物代謝酵素発現酵母を用いたスチルベノイド抱合代謝物の網羅的合成

Comprehensive synthesis of conjugated metabolites of stilbenoid using xenobiotic metabolizing enzymes expressing yeast

○中山 舞、西川 美宇、深谷 圭介、占部 大介、榊 利之、生城 真一（富山県大院工）
○Mai NAKAYAMA, Miyu NISHIKAWA, Keisuke FUKAYA, Daisuke URABE, Toshiyuki SAKAKI, Shinichi IKUSHIRO (Toyama Prefectural Univ.)

食品中のポリフェノール類は、UDP−グルクロン酸転移酵素（UGT）及び硫酸転移酵素（SULT）などの抱合酵素による構造変換を受けて抱合代謝物となり、水溶性が高められ体外に排出される。パッションフルーツ等に豊富に含まれるスチルベノイドにおいては、抱合化を受ける部位によって体内動態と共に自身が有する生理活性が大きく影響を受ける。そこで我々は、入手が困難とされる抱合代謝物標準品を酵素合成し、スチルベノイドの代謝及び代謝物自身の機能の同定を行うことを目的とした。ヒトを含めた哺乳動物由来 UGT 発現酵母 69 種とヒト由来 SULT 発現酵母 6 種を用いた代謝スクリーニングにより最適な発現酵母を選定した後、反応系のスケールアップ及び精製により 5～30mg のスチルベノイド抱合代謝物標準品を得た。質量分析法及び核磁気共鳴法を用いた構造決定により、抱合基の結合数と結合位置の異なる 17 種の抱合体であることを確認した。また、合成した抱合体に対する加水分解酵素感受性を評価したところ、親化合物の安定性や抱合化部位に依存して加水分解酵素に対する抵抗性の違いが示され、これらを考慮した血中代謝物の定量解析が必要であると示唆された。ラットを用いた投与実験におけるスチルベノイド代謝解析では、質量分析法を用いた標準品との比較により、血中におけるスチルベノイド代謝物の同定及び定量を可能にした。本研究で合成した抱合代謝物標準品を用いることで、スチルベノイドを含めた食品中機能性成分における機能性発現メカニズムの解明に貢献できるものと考えている。

Xenobiotic compounds including dietary chemicals are conjugated by xenobiotic metabolizing enzymes (XMEs), UDP-glucuronosyltransferases (UGTs) and sulfotransferases (SULTs) isoforms. Stilbene compounds having multiple hydroxyl groups are especially conjugated by enzymes, UGT or SULT isoforms. Recent reports suggest the bioavailability and physiological effects of dietary chemicals including stilbenes partly depend on formation of the conjugated metabolites. Therefore, the aim of our study is enzymatic synthesis of conjugate metabolites of stilbene using XMEs expressing yeast and to investigate the pharmacokinetics and functionality of stilbene compounds. These whole cell-dependent production systems of mammalian UGT or SULT in budding yeast cell would be a powerful tool for analyzing the pharmacokinetics and functionality of stilbene compounds as biological factors.

Xenobiotic metabolizing enzymes, Stilbene compounds, Conjugate

発表責任者：生城真一（ikushiro@pu-toyama.ac.jp）

講演番号：4D02-08
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:30～ ミーティングルーム D

ファイトケミカルの継続処理による細胞のストレス耐性の変動

Effects of multiple exposures to phytochemicals on cell stress resistance

○河口 詩歩、石坂 朱里、村上 明（兵庫県大・環境人間）
○Shiho KAWAGUCHI, Akari ISHISAKA, Akira MURAKAMI (Univ. of Hyogo)

【背景および目的】ファイトケミカルの機能性に関するこれまでの多くの研究では、培養細胞を用いた単回処理による評価が行われてきた。一方、ヒトがファイトケミカルを摂取する場合は複数回、あるいは継続的な摂取が一般的である。また、ファイトケミカルはヒトを含む動物には異物であることから、こうした慢性的な摂取が生体防御機構の強化に寄与することが想定できる。そこで本研究では培養細胞をファイトケミカルで複数回処理した場合の機能性を評価することを目的とした。
【方法および結果】ファイトケミカルの暴露濃度が比較的高いと想定される胃に着目し、正常胃粘膜上皮細胞 RGM1 を用いた。また、評価試料としては第二相解毒酵素群の誘導など、生体防御機能の活性化作用が広く知られる allyl isothiocyanate (AITC)を選定した。まず、RGM1 細胞を AITC (90 μM)で処理すると 24 hr 後の細胞生存率は 27%となり強い細胞毒性が観察された。次いで、①本処理の 48 hr 前に低濃度の AITC (30 μM)で 24 hr 処理した場合、②本処理の 24 hr 前に低濃度の AITC (30 μM)で 24 hr 処理した場合、③①および②の両方処理した場合の 3 種の前処理方法を設定した。その結果、②および③の場合の細胞生存率はそれぞれ 52%および 53%と有意に高くなり、顕著な細胞保護効果が認められた。一方、高濃度 (90 μM) 処理する 48 hr 前の処理では生存率が 33%であったことから、②の前処理効果は 24 hr 以降では減衰することが示唆された。従って、低濃度の AITC (30 μM) による前処理は高濃度(90 μM)の AITC が誘起するケミカルストレスに対する細胞の防御機構を強化させると推察された。AITC は、代表的なストレス応答タンパク質である heme oxygenase-1 (HO-1)の発現を増加させたことから、現在、前処理①–③を行なった際の発現変化などを解析している。

In this study we examined the effects of multiple exposures of cultured cells to phytochemicals to clarify if they can amplify defensive capacity. We used RGM1 rat normal stomach epithelial cells being exposed to allyl isothiocyanate (AITC), the representative pungent in wasabi. When the cells were exposed to AITC at a high concentration of 90 μM for 24 hr, the cell viability downed to 27%. On the other hand, pretreatment with a lower concentration of AITC (30 μM) for 24 hr followed by that at 90 μM for 24 hr suppressed its cytotoxicity where the cell viability was 52%. These results suggest that chemical training with a low concentration of AITC may enhance the self-defense capacity. We are currently investigating the effects of AITC on heme oxygenase-1 (HO-1) expression in RGM1 cells, which is known as one of the major self-defensive enzymes.

phytochemicals, allyl isothiocyanate, stress resistance

発表責任者：村上明（akira@shse.u-hyogo.ac.jp）

講演番号：4D02-09
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:30～ ミーティングルーム D

品種改良ケールから単離したエクソソーム様ナノ粒子のコラーゲン産生促進作用

Exosome-like nanoparticles isolated from breeding kale promote collagen production in human skin fibroblast

○小池 えみり[1]、上條 友梨子[2]、市川 紗貴[2]、スパッタ チャワリットポン[2]、大野 智弘[3]、中村 宗一郎[2]、片山 茂[1,2,4] ([1]信州大農、[2]信州大院・農、[3]ヤクルトヘルスフーズ、[4]信州大・バイオメディカル研)

○EMIRI KOIKE[1], YURIKO KAMIJO[2], SAKI ICHIKAWA[2], Chawalitpong Supattra[2], TOMOHIRO OHNO[3], SOICHIRO NAKAMURA[2], SHIGERU KATAYAMA[1,2,4] ([1]Shinshu Univ., [2]Shinshu Univ. Grad. Sch., [3]Yakult Health Foods Co., Ltd., [4]Shinshu Univ. IBS)

エクソソームは様々な細胞が分泌する膜小胞であり、離れた細胞や組織に情報を伝達するための役割を担う。近年、植物からエクソソーム様ナノ粒子（Exosome-like nanoparticles, ELNs）が単離され、植物由来 ELNs がマウスの遺伝子発現を制御することが報告されている。我々は、グルコラファニン高含有の品種改良ケールを老化促進マウス SAMP1 に長期摂取させることで、皮膚中コラーゲン量が増加することを明らかにした。本研究では、品種改良ケールから ELNs を単離し、正常ヒト皮膚線維芽細胞におけるコラーゲン産生促進作用を検討した。ケール搾汁粉末から ELNs を密度勾配遠心法により単離精製した。ケール ELNs の最頻粒子径は 122 nm と一般的なエクソソームと同程度のサイズであった。ケール ELNs を NB1RGB 細胞に添加したところ、I 型コラーゲンの発現は顕著に増加した。コラーゲン産生には TGF-β シグナル伝達経路の関与が報告されているが、TGF-β II 型受容体の発現は見られなかった。DiI 標識による蛍光顕微鏡観察において、ケール ELNs は NB1RGB 細胞に取り込まれることを確認した。以上の結果より、ケール ELNs は線維芽細胞に取り込まれ、コラーゲン産生を促進することが示唆された。

Exosome is a nanoscale vesicle and it is secreted from cell to extracellular space by exocytosis. Exosome plays important roles in intracellular communications. Recently, it has been reported that exosome-like nanoparticles (ELNs) isolated from plants regulate gene expression in mice. We demonstrated that long-term oral administration of inbreeding kale with high amount of glucoraphanin enhanced the collagen production in senescence-accelerated mice, SAMP1. The purpose of this study was to isolate ELNs from the breeding kale and evaluate the effects on collagen production in normal human skin fibroblast NB1RGB cells.

ELNs were isolated and purified from the breeding kale using density gradient centrifugation. The mode particle size of kale ELNs was 122 nm, which was about the same size as general exosome. A significant increase in type I collagen expression was observed when NB1RGB cells were treated with kale ELNs. On the other hand, the expression of TGF-β receptor type II, which induces collagen production via signal transduction, remained unchanged by the treatment with kale ELNs. DiI fluorescence-labeled kale ELNs were clearly observed in the NB1RGB cells. These results suggest that kale ELNs were uptaken and promoted collagen production in human skin fibroblast.

kale, exosome, collagen

発表責任者：片山茂（skata@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：4D02-10
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:30～ ミーティングルーム D

フラバンジェノールは皮膚で TERT を強制発現させ、発毛を促進する

Flavangenol promotes hair growth by augmenting *TERT* expression

○小川 瑞紀[1]、森川 琢海[2]、髙野 晃[2]、神谷 智康[2]、髙垣 欣也[2]、片倉 喜範[1] ([1]九州大生資環、[2]株式会社東洋新薬)
○ Mizuki OGAWA[1], Takumi MORIKAWA[2], Akira TAKANO[2], Tomoyasu KAMIYA[2], Kinya TAKAGAKI[2], Yoshinori KATAKURA[1] ([1]Kyushu Univ., [2]TOYO SHINYAKU Co.,Ltd.)

薄毛は人々の精神や生活の質に影響を及ぼすため、育毛剤の開発のためにこれまで多くの研究が行われてきた。先行研究により、皮膚でのテロメラーゼ逆転写酵素（*TERT*）の過剰発現は、毛包幹細胞を活性化して、毛周期における成長期の開始を引き起こし、毛髪合成を促進することが明らかにされている。

フランス南西部ランド地方に生育する海岸松の樹皮から抽出される東洋新薬の独自素材である『フラバンジェノール®』は、ポリフェノールの一種であるオリゴメリック・プロアントシアニジン（OPC）を含み、抗酸化作用をはじめとした様々な生理活性を示し、近年強力な美白作用や抗シワ作用が確認され、各分野で注目を集めている。

そこで、本研究では、フラバンジェノール®が *TERT* 発現を増強し、発毛効果を示すか検討することを目的とした。その結果、フラバンジェノール®は *TERT* 発現を増強するとともに、マウス背部皮膚への塗布試験により発毛効果を有することを明らかにした。以上の結果から、フラバンジェノール®は毛包幹細胞の増殖を誘導することにより休止期から成長期への移行を誘導し、毛の成長を促進するものと考えられた。

Thinning hair and alopecia have implications for mental health and quality of life. Therefore, a large number of studies have been carried out to develop novel hair growth agents.Previous studies have shown that augmenting telomerase reverse transcriptase (*TERT*) in the skin activates hair follicle stem cells, inducing transition anagen in the hair cycle and promoting hair synthesis.

"Flavangenol®", a unique material of Toyo Shinyaku extracted from the bark of coastal pine trees growing in the land region of southwestern France, contains oligomeric proanthocyanidins (OPC), which is a type of polyphenol, and has an antioxidant effect. In recent years, it shows various physiological activities such as a strong whitening effect and a anti-wrinkle effect and is attracting attention in each field.

Therefore, in the present study, we aimed to examine whether flavangenol® activates *TERT* expression and exhibits a hair growth effect. As a result, it was clarified that flavangenol® activated *TERT* expression and has a hair growth promotion in the back skin of mice. These results demonstrate that flavangenol® induced a shift from telogen to anagen in hair follicle by causing differentiation and inducing proliferation of hair follicle bulge stem cells and promoted hair growth.

TERT, Flavangenol, hair growth

発表責任者：片倉喜範（katakura@grt.kyushu-u.ac.jp）

講演番号：4D02-11
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:30～ ミーティングルーム D

老化による生理機能の変化に対するα-グリセロホスホコリン摂取効果の検討

Efficacy of α-glycerophosphocholine on aging-related phenomena in old mice

○成川 真隆[1,2]、上吉原 絢[1]、伊豆 英恵[3]、藤井 力[3,4]、松原 主典[5]、三坂 巧[1]([1]東大院農生科、[2]京都女子大家政、[3]酒総研、[4]福島大食農、[5]広島大院人社科)
○Masataka NARUKAWA[1,2], Aya KAMIYOSHIHARA[1], Hanae IZU[3], Tsutomu FUJII[3,4], Kiminori MATSUBARA[5], Takumi MISAKA[1] ([1]The Univ. Tokyo, [2]Kyoto Women's Univ., [3]Natl. Res. Inst. of Brewing., [4]Fukushima Univ., [5]Hiroshima Univ.)

α-グリセロホスホコリン（GPC）は卵や牛乳、大豆などに含まれるコリン前駆体である。GPC の機能性として、老化に伴う認知機能低下の抑制作用が知られている。しかし、その抑制メカニズムの詳細は不明である。一方、老化は味感受性やエネルギー代謝にも影響を与えるが、GPC 摂取がそれら老化現象に対しても有効であるかどうかはよくわかっていない。本研究では、GPC 摂取による認知機能低下の抑制メカニズムと、味感受性やエネルギー代謝の低下といった老化に関連した事象における GPC 摂取効果を検討した。60 週齢からおよそ 1 年間 GPC 混餌食を摂取させた高齢マウス（C57BL/6J 系統・雄）を対象として解析を行ったところ、海馬において GPC 摂取により老化に伴う長期記憶関連遺伝子の発現量低下が有意に抑制することを観察した。一方、老化に伴う味感受性の変化に GPC 摂取効果は認められなかったが、肝臓のβ酸化関連遺伝子の発現が有意に改善することを見出した。これらの結果は、GPC 摂取による認知機能低下の抑制効果が長期記憶関連遺伝子の発現量改善に起因する可能性と、GPC 摂取が脂質代謝も改善させる可能性を示唆する。

α-glycerophosphocholine (GPC) is a natural source of choline. It reportedly prevents aging-related decline in cognitive function; however, the mechanism underlying the prevention remains unclear. Although it is understood that aging influences taste sensitivity and energy regulation, whether GPC exerts anti-aging effects on such phenomena requires further elucidation. We used old C57BL/6J mice that were fed GPC-containing diet, to investigate the molecular mechanisms underlying prevention of the decline in cognitive function associated with aging, and examine the beneficial effects of GPC intake on aging-related phenomena, such as taste sensitivity and energy regulation. We confirmed that GPC intake reduces the aging-related decline in the expression levels of genes related to long-term potentiation. Although we did not observe an improvement in aging-related decline in taste sensitivity, there was a notable improvement in the expression level of β-oxidation associated gene in old mice. Our results suggest that the prevention of aging-related decline on cognitive function by GPC intake may be associated with the improvement of gene expression levels of long-term potentiation; furthermore, GPC intake may positively influence lipid metabolism.

Aging, GPC, Taste sensitivity

講演番号：4D02-12
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:30～ ミーティングルーム D

抗酸化作用をもつ真珠層多糖の記憶障害改善作用

Polysaccharide in nacre layer of pearl oyster improves scopolamine-induced memory impairment through antioxidant activity.

○若生 真由美、山上 光、長谷川 靖（室蘭工業大学）
○Mayumi WAKO, Hikaru YAMAGAMI, Yasushi HASEGAWA (Muroran Institute of Technology)

背景・目的）真珠は、中国では古くから近視や精神安定などの漢方薬として数多く用いられているが、その生理活性物質や作用機構に関する知見はほとんどない。我々は真珠とほぼ同じ構造をもつアコヤガイ貝殻真珠層に含まれる成分が、スコポラミンで誘発した記憶障害を改善することを明らかにしてきた。本研究では、その記憶障害改善作用をもつ生理活性物質の単離とその作用メカニズムの解明を目指し研究を行った。
方法・結果・考察）アコヤガイ貝殻真珠層を酢酸溶液で脱灰後、水溶性画分を抽出し 3 種類のカラムを用いて、記憶改善作用を有する多糖を単離した。この多糖は硫酸基、ウロン酸を含む約 750 kDa の酸性多糖であり、抗酸化活性を示すことを明らかにした。スコポラミンで誘発した記憶障害マウスに対する多糖の作用機構を明らかにするため、脳内の抗酸化活性について検討したところ、多糖の投与は、スコポラミンの投与で生じた酸化障害を抑制することが分かった。また、多糖の投与は、スコポラミン投与にともなう記憶に関わる脳由来栄養因子（BDNF）や抗酸化タンパク質などの mRNA 発現量の低下を有意に抑制した。真珠層に含まれる成分はアミロイドβ誘発の記憶障害モデルマウスなどに対しても有効であったことから、認知症に対する薬として有効であるかもしれない。

We have shown that administration of nacre extract led to a recovery from scopolamine-induced memory impairments in object recognition, short-term memory, and spatial memory. In this study, we isolated memory improving substance using ion exchange column chromatography and reverse phase column chromatography. Isolated substance is sulphated polysaccharide which has a molecular weight of about 750 kDa. Monosaccharide composition analysis showed to be rich in galactose, glucose, and mannose and contained uronic acid. To elucidate the molecular mechanism underlying the neuroprotective effect of the polysaccharide, the mRNA expression level involved in oxidative stress, inflammatory response, and neuroprotective factor in cortex were investigated. Treatment with nacre extract increased the expression levels of antioxidant enzymes such as MnSOD, CuZnSOD and attenuated the scopolamine-mediated up-regulation of inflammatory cytokines of IL-1 and iNOS. In addition, the polysaccharide also attenuated suppression of the expression of brain-derived neurotrophic factor (BDNF), nerve growth factor (NGF) and their receptors. These findings strongly suggest that the polysaccharide in nacre exerts anti-amnesic effect through preventing oxidative stress and inflammation.

antioxidant, memory, polysaccharide

発表責任者：若生真由美（17023128@mmm.muroran-it.ac.jp）

講演番号：4D02-13
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:30～ ミーティングルーム D

乳由来βラクトリンの頭頂葉領域の神経活動活性化による注意集中力向上

β-lactolin enhance focusing attention via the activation temporal lobe area

○金留 理奈[1]、阿野 泰久[1]、品川 和志[2]、井出 弓子[3]、柴田 みどり[2]、梅田 聡[2]([1]キリンホールディングス株式会社、[2]慶應大、[3]東京センタークリニック)
○Ayana KANATOME[1], Yasuhisa ANO[1], Kazushi SHINAGAWA[2], Yumiko IDE[3], Midori SHIBATA[2], Satoshi UMEDA[2] ([1]Kirin Holdings Company, [2]Keio Univ., [3]Tokyo Center Clinic)

超高齢社会となった国内では認知機能低下や認知症が大きな社会課題となる中、日常生活を通じた予防に注目が集まっている。近年の日本人対象の疫学調査によると、牛乳及び乳製品の摂取は認知症リスクを低減するとされ、非臨床試験ではカマンベールチーズにアルツハイマー病予防効果が報告されている。我々はこれまで β ラクトグロブリン由来で Trp–Tyr 配列を有した β ラクトペプチドおよび Gly–Thr–Trp–Tyr テトラペプチドである β ラクトリンがモデル動物の認知機能を改善し、アルツハイマー病予防効果を報告している。また、健常中高齢者対象の試験で、β ラクトリンが記憶力および注意力を改善することを報告しているが、ヒトでの作用メカニズムの検証はまだなされていなかった。そこで本研究では、β ラクトリンの摂取が課題遂行中の脳活動へ及ぼす影響を調べるために、健常中高齢者を対象にランダム化二重盲検比較試験を実施した。45～64 歳の健常中高齢男女 30 名を 15 名ずつに割り付け、β ラクトリン含有錠剤もしくはプラセボを 6 週間摂取させた。事前および摂取 6 週目に 64 チャネル脳波計を用いて課題提示中の脳波情報を計測した。その結果、β ラクトリン群では聴覚刺激呈示課題中の事象関連電位 P300 の振幅が、頭頂葉領域の Cp2 および前頭葉-頭頂葉領域の C4 電極において、プラセボ群と比較して統計学的に有意な高値を示した(p=0.011 および 0.02)。頭頂葉領域の P300 の振幅増大は特定情報へ集中する注意機能の高まりを示唆し、これまでの β ラクトリンの注意力改善の結果を支持するものである。本結果より、β ラクトリン摂取は前頭葉－頭頂葉周辺の神経活動活性化により注意力を向上することが期待される。

Epidemiological studies have shown dairy product consumption as beneficial for cognitive function in elderly individuals. β-lactolin is a lacto-tetrapeptide Gly–Thr–Trp–Tyr that improves cognitive performance in older adults and prevents Alzheimer’s pathology in rodents. There has been no study on β-lactolin effects on neural activity in human. In this randomized double-blind placebo-controlled study, we evaluated the β-lactolin effects on neural activity in humans using event-related potentials. For 6 weeks, 30 participants (45-64 years old) were supplemented with β-lactolin or placebo. Neural activity during tasks was measured through 64-channel electroencephalography. Compared with the placebo group, the β-lactolin group had a statistically significantly higher P300 amplitude at the Cp2 and C4 sites during auditory tasks on week 6. β-lactolin supplementation could promote neural activity in the fronto-parietal areas. Our findings provide insight into the mechanisms underlying the β-lactolin effects on attention in healthy adults.

whey, peptide, cognitive function

発表責任者：金留理奈（Ayana_1_Kobayashi@kirin.co.jp）

講演番号：4D02-14
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:30～ ミーティングルーム D

脳虚血モデルラットにおけるエステル型オキシリピンの解析とその機能解明

Alternation of arachidonic acid and docosahexaenoic acid epoxides bound to neutral lipids following acute hypercapnia/ischemia in rat brain

○乙木 百合香[1,2]、加藤 俊治[1]、仲川 清隆[1]、Ameer Taha[2] ([1]東北大農、[2]カリフォルニア大学デービス校)
○Yurika OTOKI[1,2], Shunji Kato[1], Kiyotaka Nakagawa[1], Taha Ameer[2] ([1]Tohoku Univ., [2]Univ. of California, Davis)

脳において、長鎖多価不飽和脂肪酸は種々の酵素によって酸化され、生理活性物質であるオキシリピンへと代謝される。オキシリピンは遊離型とリン脂質（PL）やコレステロールなどの中性脂質（NL）に結合して存在しているエステル型とが存在するが、これまでの研究では主に遊離型のみに焦点が当てられてきたため、脳中のエステル型オキシリピンの機能や代謝機構はほとんど不明である。そこで、本研究では、脳におけるエステル型オキシリピンの機能解明を目的に、PL および NL にエステル結合しているオキシリピンの分析法を構築し、脳虚血モデルラットの脳を分析した。まず、固相抽出を用いて PL および NL に分離精製後、加水分解によってオキシリピンを得、UPLC-MS/MS にて定量分析を行った。その結果、脳中オキシリピンの多くはエステル型で存在していることが分かった。さらに脳虚血モデルラットの脳では、NL 中のドコサヘキサエン酸由来のエポキシ体が特異的に減少し、逆にアラキドン酸のエポキシ体が増加していることが明らかとなった。これらの遊離型は、脳において神経保護作用や抗炎症作用が知られているが、エステル型、特に NL に結合しているエポキシ体も虚血脳において重要な機能を有していることが示唆された[1]。

In brain, most oxylipins are esterified to complex lipids. However, the significance of this esterification process and its physiological function is not known due to lack of an analytical method. In this study, we developed a separation method to quantify esterified oxylipins within phospholipids (PL), and neutral lipids (NL) (i.e. triacylglycerol and cholesteryl ester) and measured NL and PL oxylipins in brain of rats subjected to acute hypercapnia/ischemia. PL and NL were separated by solid phase extraction, hydrolyzed, purified, and analyzed with UPLC-MS/MS. Most of the oxylipin species were extracted with acceptable separation and recovery. In NL fraction, two epoxides derived from arachidonic acid (ARA) were significantly increased, and three epoxides derived from docosahexaenoic acid (DHA) were significantly decreased in rats subjected to hypercapnia/ischemia compared to controls. It is suggested that NL oxylipins are involved in the regulation of free ARA and DHA epoxide turnover following acute brain injury[1].

1) Y. Otoki *et al. Lipids,* 2019

oxylipin, ischemia brain, epoxide metabolite

発表責任者：乙木百合香（yurika.otoki.d7@tohoku.ac.jp）

講演番号：4D02-15
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:30～ ミーティングルーム D

ビタミン C 欠乏ラットのビタミン C 摂取行動には味覚が関与する

Taste perception is involved in vitamin C ingestive behavior in vitamin C-deficient rats.

○沼上 真佑[1]、竹名 麻子[2] ([1]明治大院農、[2]明治大農)
○Mayu NUMAGAMI[1], Asako TAKENAKA[2] ([1]Grad. Meiji Univ., [2]Meiji Univ.)

【背景・目的】我々は、ビタミン C（VC）合成能欠如モデルである Osteogenic Disorder Shionogi（ODS）ラットに VC 含有水と水を同時に呈示すると、VC 含有水の濃度に関わらず、一定量の VC を選択摂取することを見いだした。本研究では、この VC 摂取行動に味覚が関与する可能性を検討した。【方法・結果】5 週齢の雄性 ODS ラットに対して、鼓索神経応答を生じる閾値以上の濃度の VC 含有水（2 g/L および 1 g/L）、または閾値以下の濃度の VC 含有水（0.05 g/L および 0.02 g/L）と水を同時に呈示する二瓶選択試験を 14 日間行い、VC 摂取行動を解析した。その結果、2 g/L および 1 g/L の VC 含有水を呈示されたラットは、先行研究と同様にいずれも一定量の VC（6.8 mg/day）を摂取した。一方で、0.05 g/L および 0.02 g/L の VC 含有水では一定量を摂取する行動は確認されず、VC 摂取量は 2 g/L および 1 g/L の VC 含有水を呈示された群よりも著しく低下した（0.6, 0.2 mg/day）。また、体内 VC 濃度は VC 摂取量に応じて変化し、2 g/L および 1 g/L VC 含有水の二瓶選択群はほぼ等値を示したのに対して、0.05 g/L および 0.02 g/L VC 含有水の二瓶選択群では著しく低下した。【結論】ODS ラットは味覚に依存して一定量の VC を摂取することが示唆された。

[Purpose] We have reported that Osteogenic Disorder Shionogi (ODS) rats that lacks the ability to synthesize vitamin C (VC), selectively consumed a certain amount of VC in two-bottle choice tests with a choice between water and VC-containing water, regardless of the concentration of VC. In this study, we examined the possibility that taste perception plays a role in this VC ingestive behavior. [Methods] Two-bottle choice tests were performed with 5-week-old male ODS rats for 14 days. Rats received a choice between VC-solution with concentrations that elicit chorda tympani nerve response (2 g/L or 1 g/L) or with lower concentrations (0.05 g/L or 0.02 g/L) and water. [Results] Rats given 2 or 1 g/L VC-containing water consumed same amount of VC, demonstrating the reproducibility of the previous results. On the other hand, rats given 0.02 or 0.05 g / L VC-water had lower VC intake than rats given VC-water with high concentrations, and the VC intake was not constant between the two groups. [Conclusion] The results indicated that taste perception is involved in vitamin C ingestive behavior in vitamin C-deficient rats.

vitamin C, ingestive behavior, taste

発表責任者：竹中麻子（takenaka@meiji.ac.jp）

講演番号：4D04-01
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:30～ ミーティングルーム D

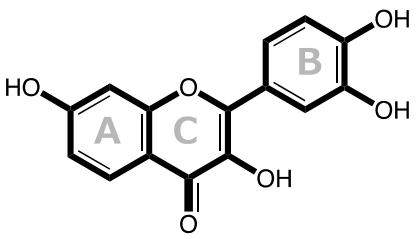
血管異常収縮を予防する桑葉の特性解析

Characterization of mulberry leaves in prevention of vascular abnormal contraction

○鶴留 奈津子、南 雄二、加治屋 勝子 (鹿児島大院連農)
○Natsuko TSURUDOME, Yuji MINAMI, Katsuko KAJIYA (Kagoshima Univ.)

血管異常収縮は、血圧や血流を一定に保つ正常収縮と異なり、最悪の場合、突然死の原因となる血管攣縮を引き起こす。血管異常収縮機構は、全容が未解明で治療薬がないことから、予防法の確立が期待されている。我々は、血管異常収縮を予防する食品の探索を行い、本研究では、桑に着目したところ、異常収縮予防効果が確認されたため、予防成分の同定と同定成分について構造活性相関を解析した。

桑は、加工方法や樹齢により細分化した 5 種類の試料を用いた。その結果、樹齢 20 年以上の老木の桑葉と製茶工程を経た桑茶葉粉末に高い異常収縮予防効果を確認した。そこで予防成分を同定するため、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)、質量分析計（LC-MS/MS）、核磁気共鳴法(NMR)などの機器分析を行ったところ、ポリフェノール類のフラボノイド群(フラボノール)に属する Fisetin であることを明らかにした。Fisetin は、これまで桑葉への含有報告は無い(特許出願済; 特願 2020-170315)。更に、Fisetin は 4 つの水酸基を有し、特徴的な構造をしているため(図)、これらの水酸基の結合位置と数が異常収縮予防効果に与える影響を確認した。まず、水酸基の結合位置による影響を検討するため、類似構造を持つフラボノイド類を比較したところ、C 環 3 位の水酸基が異常収縮の予防効果を決定づけていることを明らかにした。次に、水酸基の数による影響を検討したところ、B 環の水酸基の数が異常収縮予防効果に関与しないことも明らかにすることができた。これらに加え、本研究では他の農産物に含まれる Fisetin 含有量の比較測定や Fisetin の存在形態(アグリコン、配糖体など)についても検討したため報告する。



（図）Fisetinの化学構造式

Abnormal contraction of blood vessels causes vasospasm that may induce sudden death in the worst cases. However, the underlying mechanisms are not well known and no therapeutic drug is available as of yet. Therefore, establishing a preventive method is the need of the hour. We are constantly searching for foods that would prevent abnormal contraction in this regard. In this study, we focused on mulberry and classified into the five types. As a result, we detected mulberry leaves from 20-year-old tree and tea leaf powder had a strong preventive effect on abnormal contraction. Further, we tried to identify the compound that capable of preventing abnormal contraction and examined the structure-activity relationship. As a result, the preventive compound was identified as fisetin, which is a flavonoid polyphenol.

Mulberry leaf, Fisetin, Abnormal contraction

発表責任者：加治屋勝子（kajiya@chem.agri.kagoshima-u.ac.jp）

講演番号：4D04-02
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:30～ ミーティングルーム D

血液試料における quercetin 及び代謝物の定量方法

quantification method of quercetin and its metabolites in the blood samples

○佐藤 衣織、横田 しなの、村留 梨花、村上 明、石坂 朱里（兵庫県大・環境人間）
○Iori SATO, Shinano YOKOTA, Rika MURATOME, Akira MURAKAMI, Akari ISHISAKA (Univ. of Hyogo)

【背景・目的】これまでに、quercetin の代謝吸収機構に関する様々な研究が行われてきたが、血中濃度の主な定量方法では、血漿や血清画分が解析対象であった。その一方で、quercetin は分子疎水性が比較的高いことから、血球画分にも存在していると推察された。実際に quercetin は、血中において血漿アルブミンだけでなく、赤血球中のヘモグロビンにも結合することが示唆されている (1, 2)。また、生体内において quercetin は、quercetin-3-*O*- D−glucuronide (Q3GA) などの様々な代謝物として存在している。そこで本研究では、血液試料に quercetin や代謝物を添加後、血漿画分と血球画分に分離し、各画分から抽出を行うことで、より正確な定量方法を確立することを目的とした。
【方法及び結果】まず、SD ラットから採取した血液に抗凝固剤を入れ、quercetin または isorhamnetin を加えたところ、添加量の 40-50%は血漿画分から、20-50%は血球画分から回収された。ところが、Q3GA に関しては、両画分からの回収率は総計 40～50%と低いものであった。そこで、Q3GA を添加した血液試料をβ-glucuronidase を用いて脱抱合処理を行い quercetin に変換することで間接的に Q3GA を定量したところ、回収率は 100%近くにまで上昇した。
　以上より、quercetin などのアグリコンは血球画分にも存在していること、さらに血中の Q3GA は、脱抱合処理することでより正確に定量できることが示唆された。
参考文献 1) Fiorani M, et al. (2003) *Free Radic Res.* , 2) Murota K, et al. (2007) *J. Med. Invest.*

Most of researches on absorption and metabolism of quercetin and its metabolites employed plasma and serum samples prepared from blood. However, hydrophobic quercetin may present in the blood cell fraction since it has been reported to be associated with hemoglobin in blood cells. In this study, we attempted to quantify quercetin and its metabolites in blood cell fraction. When we added quercetin or isorhamnetin to blood sample from SD rats, 40-50% of the samples were detected in the plasma fraction, and 20-50% in blood cell one. On the other hand, the total recovery rate of quercetin-3-*O*- D−glucuronide (Q3GA) was as low as 40-50%. Then, we deconjugated this metabolite by using β-glucuronidase to yield quercetin. As the results, the recovery rate markedly increased up to approximately 100%. This novel quantification method may be valuable and significant to more precisely quantify this bioactive flavonoid and its metabolites.

Quercetin, Quercetin-3-O- D-glucuronide, metabolism

発表責任者：石坂朱里（ishisaka@shse.u-hyogo.ac.jp）

講演番号：4D04-03
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:30～ ミーティングルーム D

非哺乳類型長鎖塩基のリンパ液への吸収

Absorption of non-mammalian-type sphingoid long-chain bases from digestive tract into lymph

○三上 大輔[1]、酒井 祥太[4]、湯山 耕平[1]、西向 めぐみ[3]、向井 克之[2]、五十嵐 靖之[1] ([1]北大院先端生命、[2]ダイセル、[3]岩手大農、[4]国立感染研)
○Daisuke MIKAMI[1], Shota Sakai[4], Kohei Yuyama[1], Megumi Nishimukai[3], Mukai Katsuyuki[2], Yasuyuki Igarashi[1] ([1]Hokkaido Univ., [2]Daicel corp., [3]Iwate Univ., [4]National Institute of Infectious Diseases)

スフィンゴ脂質は長鎖塩基(LCB)を骨格に有する脂質であり、経口摂取による皮膚機能改善効果やアルツハイマー病予防効果などを示す有用な機能性食品素材である。スフィンゴ脂質は経口摂取後小腸管腔内で消化酵素により分解され LCB が遊離する。遊離した LCB は小腸上皮細胞を経てリンパ液へ移行するが詳細な吸収機構は不明である。様々なスフィンゴ脂質が機能性食品素材として利用されているが生物種によって LCB の構造は異なるため体内吸収に差があると予想される。本研究では植物、真菌、海洋生物より LCB を調製し、ラット消化管からリンパへの吸収を液体クロマトグラフ 四重極飛行時間型質量分析装置(LC-qTOFMS)で分析した。 いずれの LCB も LCB やその代謝物としてリンパ液から検出されたためどのスフィンゴ脂質素材であっても体内に吸収されることが分かった。一方で吸収率や検出された LCB 代謝物の割合は長鎖塩基により差があった。最も吸収率の高いものは 8 位の二重結合が Z 型の LCB 18:2(4E,8Z);2OH でありおよそ 1.2%がリンパ液から検出された。またリンパ液中の LCB 18:2(4E,8Z);2OH は大部分が 16:0 脂肪酸を有するスフィンゴミエリンであった。最も吸収率の低い LCB は LCB 18:3(4E,8E,10E);2OH で約 0.1%がリンパ液から回収された。本研究結果は吸収性の良い機能性食品開発やスフィンゴ脂質の生理活性機序解明に有用であると考えている。

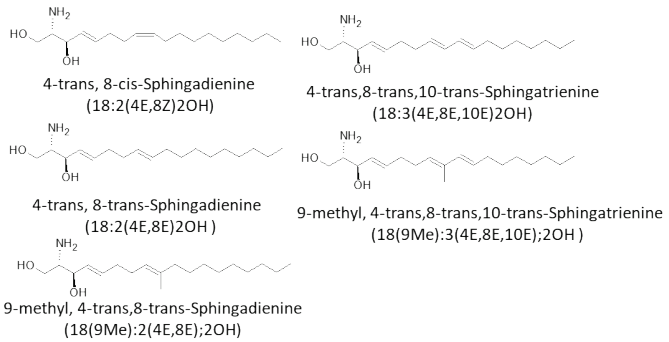


Figure 1. Structure of long-chain bases derived from plants, fungi and marine organisms.

Dietary sphingolipids show various biofunctions, including skin barrier improvement and alleviation of amyloid-β pathologies. Long-chain bases (LCBs), the essential backbones of sphingolipids, are responsible for these bioactivities, and they vary structurally between species. Given these findings, however, the absorption dynamics of each LCB remain unclear. We investigated the absorption of LCBs from gastrointestinal tract into lymph on rat.

Enterally administrated LCBs were detected in lymph as LCBs and several metabolites. The absorption percentages of LCBs were about 0.1–1.2%, depending on their structures. The highest absorbed LCB was LCB 18:2(4E,8Z);2OH which has a double bond at 8-position in this Z form.

These results cloud provide useful information for development of effective functional food materials.

Long-chain base, sphingolipids, lymph

発表責任者：三上大輔（dmikami@sci.hokudai.ac.jp）

講演番号：4D04-04
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:30～ ミーティングルーム D

カテキン重合物の侵害受容器を介した循環刺激作用の解明

Elucidation of hemodynamics action induced by epicatechin oligomers through nociceptors

○伏見 太希、越野 秀啓、小林 紗子、花城 翔詠、井上 綾乃、藤井 靖之、須原 義智、越阪部 奈緒美（芝工大理工）
○ Taiki FUSHIMI, Hideaki KOSHINO, Sako KOBAYASHI, Shouei HANASHIRO, AYANO INOUE, Yasuyuki FUJII, Yoshitomo SUHARA, Naomi OSAKABE (Shibaura Institute of Technology)

我々はこれまでに cinnamtannin A2(A2)の単回経口投与後に循環亢進作用がみられること、またこの作用が交感神経の興奮によって発現することを確認している。一方、侵害受容器のアゴニストであるカプサイシン（Cap）またはアリルイソチオシアネート（AITC）もまた交感神経活動を亢進し、循環刺激作用を発現することが知られている。そこで本研究では、A2 と侵害受容器との相互作用に着目し、以下の実験を行った。Cap または AITC をラットに単回投与した後に、一過性の循環刺激作用が見られたが、それぞれの標的分子である TRPV1 または TRPA1 の阻害剤と併用することにより、それらの作用はキャンセルされた。また A2 単回投与後にも、強い循環刺激作用が見られたが、TRPV1 または TRPA1 阻害剤との併用によってこの変化は消失した。そこで分子間のドッキングシミュレーションを実施した。その結果、Cap-TRPV1 の結合エネルギー値は低く、強い結合親和性が示唆された。一方、A2-TRPV1 の結合エネルギー値は高値を示した。また、AITC-TRPA1 の結合サイトに A2 は作用しない可能性が示唆された。これらの結果から、A2 はこれらの侵害受容器を活性化し、交感神経を興奮させることが明らかとなったが、受容器の相互作用はこれまで知られているリガンドとは異なる可能性が示唆された。

We have previously confirmed that a single oral administration of procyanidin tetramer cinnamtannin A2 (A2) has exhibited hemodynamic alterations in rodents. We also confirmed that these effects were activated by the sympathetic nerve. Capsaicin (Cap) or allyl isothiocyanate (AITC), which are nociceptor agonists, are also known to enhance sympathetic nerve activity. In the present study, we focused on the interaction between A2 and nociceptors. After a single dose of Cap or AITC, transient changes in hemodynamics were observed. These effects were canceled by co-administration of an inhibitor of TRPV1 or TRPA1. It was also observed transient hemodynamic alterations after a single dose of A2, but these changes also disappeared with a TRPV1 or TRPA1 inhibitor. In addition, we performed a molecular docking simulation using software (Molecular Operating Environment, MOE). The binding energy of Cap and TRPV1 was very low, suggesting a strong binding affinity between these two chemicals, but that of A2-TRPV1 was relatively high. It was also suggested that A2 may not bind the activate site of AITC on TRPA1. These results offered that A2 activates these nociceptors, consequently excites the sympathetic nerves. Although, the activation mechanism of A2 is suggested different from typical ligands.

Nociceptor, Epicatechin Oligomer, Hemodynamics

講演番号：4D04-05
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:30～ ミーティングルーム D

ガラクトース摂取による尿中グルコース排出促進作用に対する SGLT2 の関与の解明

Elucidation of SGLT2 contribution to the mechanism of urinary glucose excretion induced by galactose ingestion.

○佐藤 洸希、大川 咲希、大崎 雄介、駒井 三千夫、白川 仁（東北大・院農・栄養学）
○Koki SATO, Saki OHKAWA, Yusuke OHSAKI, Michio KOMAI, Hitoshi SHIRAKAWA (Lab. Nutrition, Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University)

【背景】我々は正常および糖尿病モデルラットへのガラクトース給餌が尿中グルコース排泄を増加させることを見出したが、その作用機序については未解明であった。糖尿病治療薬であるナトリウム-グルコース共輸送体 2（SGLT2）阻害薬は近位尿細管でのグルコース再吸収を阻害し、尿中グルコース排出を上昇させる。本研究では、ガラクトースによる尿中グルコース排出作用に対する SGLT2 の関与を明らかにするため、以下の解析を行った。

【方法】先天的に SGLT2 を欠損する SAMP10 マウス（雄、4 週齢）、ならびに正常マウスである SAMR1 マウス（雄、4 週齢）にコントロール飼料ならびに 10%ガラクトース添加飼料を給餌して 4 週間の飼育を行った。週 1 回、代謝ケージにより 24 時間尿を回収し、尿中グルコースならびにクレアチニン排泄量を測定した。また、飼育終了時に空腹時血糖を測定した。

【結果・考察】SAMR1 ならびに SAMP10 マウスともに、10%ガラクトース添加群ではコントロール群と比較して、飼料給餌開始 1 週間後のクレアチニン補正尿中グルコース排泄量が有意な上昇を示した。空腹時血糖値は SAMR1 では飼料による影響が見られなかったが、SAMP10 ではガラクトース添加飼料給餌により有意に空腹時血糖値の低下が見られた。以上の結果より、ガラクトースは SGLT2 非依存的に尿糖排泄を上昇させ、血糖値低下を引き起こす可能性が示された。

[Background] We found galactose administration to normal and diabetic rats increased urinary glucose excretion in a dose-dependent manner, while detailed mechanism has not been clarified. Sodium glucose cotransporter 2 (SGLT2) inhibitor, an antidiabetic drug, increases urinary glucose excretion and decreases blood glucose level in diabetic patients. In this study, we aimed to clarify the contribution of SGLT2 to galactose induced urinary glucose excretion. **[Methods]** SAMP10 mice spontaneously lacking SGLT2 and SAMR1 mice as controls were fed either a control or a 10% galactose supplement diet for 4 weeks. Once a week, we measured glucose and creatinine levels in urine. Fasting blood glucose levels were also measured at the end of the experimental period. **[Results and discussion]** The ratio of urinary glucose to creatinine excretion was significantly increased 1 week after starting the galactose supplement diet in both mice. The galactose supplement diet significantly reduced fasting plasma glucose levels compared to the control diet in SAMP10 mice, but not in SAMR1 mice. These results indicate that galactose could increase urinary glucose excretion in an SGLT2-independent manner and induce a potential decrease in plasma glucose.

galactose, sglt2, urinary glucose excretion

講演番号：4D04-06
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:30～ ミーティングルーム D

黒ショウガ（*Kaempferia parviflora*）による脳認知機能改善効果の可能性

Black ginger (*Kaempferia parviflora*) improves cognitive brain function

○吉田 泉[1]、吉田 香[2]、高橋 有志[1]、藤田 和弘[1]、五十嵐 友二[1] ([1]日本食品分析セ、[2]同志社女大)
○ Izumi YOSHIDA[1], Kaoru YOSHIDA[2], Yushi TAKAHASHI[1], Kazuhiro FUJITA[1], Tomoji IGARASHI[1] ([1]JFRL, [2]Doshisha W. Col)

高齢化社会に伴い認知症の患者数が増加し、社会的問題となっている。認知症の半分以上を占めるアルツハイマー型認知症の発症においては、脳内の活性酸素による酸化ストレスや炎症が関与すると言われており、抗酸化作用や抗炎症作用を持つ物質が予防となる可能性が示唆されている。また、近年、神経細胞の分化・再生を促進させ、脳関門通過可能な低分子物質が脳老化改善・認知症予防に有効であることも示されている。本研究では、黒ショウガ（KP)による認知機能改善効果の可能性を *in vitro* および *in vivo* の両面から検証した。*in vitro* 試験としては、PC-12 細胞に黒ショウガ抽出液（KPE）を添加し、神経突起伸長活性を調べた。その結果、KPE を添加することによって神経細胞特異的マーカーである Nf-H および Tubb3 の濃度依存的な発現上昇が遺伝子およびタンパクレベルで認められ、KP に神経突起伸長活性があることが確認できた。*in vivo* 試験としては、加齢マウスに KP を添加した飼料を 30 週間投与し、行動試験（Y 字迷路試験、新奇物体探索試験、受動回避試験）および脳の免疫組織染色(Iba1)を行った。短期記憶の指標となる Y 字迷路試験および視覚的認知記憶の指標となる新奇物体探索試験において KP の認知機能改善効果が認められた。また、マウス脳組織の神経炎症状態を Iba1 タンパクの発現により調べたところ、海馬，大脳皮質とも KP による Iba1 タンパクの発現抑制効果が認められ、KP 投与によって脳内炎症が抑制されるものと推察された。以上のことより、KP に認知機能改善効果がある可能性が示唆された。

In this study, we examined the possibility of cognitive improvement effects of black ginger (KP) both *in vitro* and *in vivo*. *In vitro*, the neurite outgrowth activity was examined using PC-12 cells. KP increased the expression of Nf-H and Tubb3, nerve cell-specific markers, at both gene and protein levels, confirming that KP has neurite outgrowth activity. *In vivo*, a diet containing KP was administered to aged mice for 30 weeks, and behavioral tests (Y-shaped maze test, novel object recognition test and passive avoidance test) were performed. In the Y-shaped maze test, an index of short-term memory, and the novel object recognition test, an index of visual cognitive memory, the improvement of cognitive function by KP was observed. In addition, the neuroinflammation state of mouse brain tissue was examined by the expression of Iba1 protein using immunohistochemical staining. The inhibitory effect of Iba1 protein expression by the KP diet was observed in both the hippocampus and the cerebral cortex, considering that the inflammation in the brain was suppressed by KP. These results suggested that KP may improve cognitive brain function.

black ginger, cognitive, PC12

発表責任者：吉田　泉（yoshidai@jfrl.or.jp）

講演番号：4D04-07
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:30～ ミーティングルーム D

社会的敗北ストレスマウスに対するカテキンオリゴマーの行動薬理学的検証

Catechin oligomer reduces anxiety behavior induced by social defeat stress and improves spatial memory

○藤井 靖之[1]、伏見 太希[1]、坂田 純[1]、松永 祥孟[1]、平 修[2]、越阪部 奈緒美[1]([1]芝浦工大、[2]福島大食農)
○Yasuyuki Fujii[1], Taiki Fushimi[1], Jun Sakata[1], Shoma Matsunaga[1], Shu Taira[2], Naomi Osakabe[1]([1]Shibaura Institute of Technology, [2]Fukushima Univ.)

適度なストレスはストレス耐性の獲得を促し、健康の維持増進に繋がることが知られている。我々はカテキンオリゴマーの摂食刺激がストレッサーとして青斑核-ノルアドレナリン作動性神経網を刺激することを見出した。そこで本研究では、社会的敗北ストレスモデルマウスにおいてカテキンオリゴマー反復投与がどのように影響するかについて観察することとした。C57BL/6J 雄性マウスに 10 日間カテキンオリゴマーを投与するとともに社会的敗北ストレス負荷を反復し、11 日目にソーシャルインタラクションテストを、12 日目に認知試験を実施し、解剖した。ストレス負荷・vehicle 投与群では、ソーシャルインタラクションテストにおいて、コーナーゾーンの滞在時間が顕著に増加したのに対して、ストレス負荷・カテキンオリゴマー群ではこの増加が抑制された。位置認識試験において、非ストレス・vehicle 投与群に比較して、非ストレス・カテキンオリゴマー投与群では移動させた物体の探索時間が有意に上昇した。また、蛍光免疫染色法で海馬・歯状回における BrdU 陽性細胞を検出したところ、非ストレス・カテキンオリゴマー投与群では非ストレス・vehicle 投与群に比較し BrdU 標識数が有意に上昇した。これらの結果から、カテキンオリゴマーは社会的敗北ストレスに対するストレス耐性を誘導すること、また青斑核-ノルアドレナリン作動性神経網を介して、海馬の歯状回が反復刺激した結果、神経新生を亢進し、空間記憶を向上させることが示された。

Moderate stress is known to promote the acquisition of stress resilience. We have previously found that catechin oligomers stimulate the locus coeruleus-noradrenergic systems as a stressor. In the present study, we examined the repeated ingestion of catechin oligomer to stress resilience and cognitive function in social defeat stress model mice. The social interaction test was conducted on the 11th day, and the recognition test was performed on the 12th day. The expression of BrdU in the dentate gyrus was detected by fluorescence immunostaining. In social interaction tests, the stress-vehicle group increased spent time in the corner zone significantly, whereas the stress-catechin oligomers were suppressed. In the object location test, search time for a moved object was significantly increased in the non-stress-catechin oligomer group than in the non-stress-vehicle group. In addition, the number of BrdU expressions was significantly increased in the non-stressed-catechin oligomer group than in the non-stressed-vehicle group. These results suggest that catechin oligomers induced stress resilience to social defeat stress. In addition, neurogenesis was induced in the dentate gyrus of the hippocampus, suggesting that spatial memory was improved.

catechin oligomer, locus coeruleus noradrenaline system, spatial memory

講演番号：4D04-08
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:30～ ミーティングルーム D

カテキン重合物の覚醒作用に関する検討

Epicatechin oligomers exhibit arousal induced by activation of sleep active neuron

○坂田 純、藤井 靖之、佐藤 史隆、牟田 織江、伏見 太希、越阪部 奈緒美（芝工大）
○ Jun SAKATA, Yasuyuki FUJII, Fumitaka SATO, Orie MUTA, Taiki FUSHIMI, Naomi OSAKABE (Shibaura Institution of Technology)

現在の日本における大きな社会問題である「睡眠負債」を解決するためには、睡眠−覚醒サイクルの維持が重要である。近年の研究で、睡眠−覚醒サイクルは視床下部視索前野のスリープアクティブニューロン（SAN）によって調節されることが明らかとなり、アデノシンなどによって活性化され睡眠が、またノルアドレナリンなどによって不活性化することで覚醒が促される。睡眠の改善については様々な提案がなされているが、その一方「すっきり目覚める」ための方法論については、未だ取り組みは不十分である。そこで本研究では、既に中枢神経刺激作用が見出されているカテキン重合物（Flavan 3-ols;FL）が覚醒効果を示すかどうかについて検証することとした。C57BL/6J 雄性マウスを vehicle、FL 群に分け、単回経口投与直後からオープンフィールド試験を実施した。その後、マウスの行動を観察するとともに総移動距離を測定した。Vehicle 投与群では、一定探索行動ののち睡眠状態が確認された。一方、FL 投与群では、投与直後から 120 分まで覚醒状態が維持された。我々はこれまでにイメージング質量分析法を用いて FL の単回経口投与が投与直後から青斑核を活性化させ、ノルアドレナリンを視床下部に投射することを見出している。これらのことから、FL の覚醒作用は SAN に対するアドレナリンの投射により発現することが示唆された。

It is important to maintain the sleep-wake cycle in order to improve the "lack of sleep". Recently, the sleep-wake cycle has been regulated by the sleep-active neurons (SAN) in the preoptic area of the hypothalamus. Sleep is induced by the activation of SAN thorough adenosine or so on, and awakeness is caused by inactivation of SAN via adrenaline etc. There was various proposals to improve sleep, the other hand, it is is still insufficient the effort for "best wake up". In present study, we examine whether the (-)-epicatechin oliomers (Flavan 3-ols; FL), which has been found to stimulate central nervous system, exhibits a wakefulness effect. C57BL / 6J male mice were divided into vehicle and FL groups, and an open field test was conducted immediately after a single oral administration. After that, the behavior of the mice and the total distance traveled were observed. In the vehicle group, the sleep state was observed after a exploratory period. On the other hand, in the FL group, the wakefulness was maintained from immediately after the administration to 120 min. We have previously found that a single oral dose of FL activates the locus coeruleus and projects noradrenaline signals into the hypothalamus. These results suggest that the arousal effect of FL is expressed by the projection of adrenaline for SAN.

epicatechin oligomer, sleep-arousal cycle, sleep active neroun

講演番号：4D04-09
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:30～ ミーティングルーム D

ロスマリン酸による Neuro-2a 細胞の JNK/STAT3 シグナル伝達経路の活性化を介した神経突起伸長作用の解明

Rosmarinic acid promotes neurite outgrowth through activating JNK/STAT3 pathway in neuroblastoma Neuro-2a cells

○富岡 拓磨[1]、石井 剛志[2]、赤川 貢[1] ([1]大阪府大院・生命環境、[2]神戸学院大院・栄養)
○Takuma Tomioka[1], Takeshi Ishii[2], Mitsugu Akagawa[1] ([1]Osaka Prefec. Univ., [2]Kobe Gakuin Univ.)

現在、我が国では 65 歳以上の約 17%が認知症を患っており、今後の超高齢化に伴って患者数はさらに増加すると予想されている。認知症の主要な発症要因として中枢神経系における神経細胞数の減少や神経突起の萎縮による神経回路網傷害があげられる。一方で、神経幹細胞の分化による神経細胞の補充や機能の回復が認知症の改善に寄与すると考えられている。ロスマリン酸は抗うつ効果や抗炎症作用など様々な生理機能を有することが報告されており、ロスマリン酸を豊富に含有するローズマリーは古くから記憶能力を向上させる効果があると知られていた。そこで本研究は、神経細胞モデルとしてマウス神経芽細胞腫由来 Neuro-2a 細胞を用いて、ロスマリン酸の神経分化と神経突起伸長作用を検証し、その作用機構を解明することを目的とした。ロスマリン酸を Neuro-2a 細胞に曝露し、48 時間後の細胞形態を観察したところ、濃度依存的な神経突起の伸長及び突起数の増加が認められた。また、神経分化マーカーである β-tubulin 3 と neurofilament のタンパク質レベルと *MAP2*、*NeuN*、及び *SYP* の mRNA 発現量の増加が確認された。さらに神経分化に関与するシグナル伝達経路を解析したところ、ロスマリン酸は JNK と STAT3 のリン酸化を誘導して活性化することが判明した。また、JNK 阻害剤により、ロスマリン酸による STAT3 のリン酸化と神経突起伸長作用が抑制された。したがって、ロスマリン酸は JNK/STAT3 シグナル伝達経路の活性化により、神経突起の伸長を誘導することが明らかになった。

Neurodegenerative disorders, which is the root cause of dementia, are characterized by slow and progressive neuronal dysfunction induced by the degeneration of neuronal cells in the central nervous system. Neurite outgrowth is a phenomenon that enables neurons to project their axons and dendrites from their cell bodies during neuronal differentiation, and plays an important role in promoting axonal regeneration after nerve injury or neurodegenerative diseases. In this study, we tested the effect of rosmarinic acid, a polyphenol in various medicinal plants including rosemary, on neurite outgrowth using mouse neuroblastoma Neuro-2a cells. Rosmarinic acid significantly increased the percentage of neurite-bearing cells, and the number of neurites in a dose-dependent manner. These morphological changes were accompanied by increase in protein and mRNA levels of differentiation markers (β-tubulin 3, neurofilament, MAP2, NeuN, and SYS). Furthermore, mechanistic studies demonstrated that rosmarinic acid promotes neurite outgrowth through activating JNK/STAT3 pathway in Neuro-2a cells.

rosmarinic acid, neurite outgrowth, neurodegenerative disorders

発表責任者：赤川貢（akagawa@biochem.osakafu-u.ac.jp）

講演番号：4D04-10
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:30～ ミーティングルーム D

苦味細胞における転写因子 Eya1 の発現

Expression of a transcription factor Eya1 in bitter taste receptor cells

○應本 真[1]、北本 颯希[2]、廣田 順二[1,2] ([1]東工大バイオセンター、[2]東工大生命理工)
○Makoto Ohmoto[1], Satsuki Kitamoto[2], Junji Hirota[1,2] ([1]Bio-Center, Tokyo Tech, [2]Sch of Life Sci and Tech, Tokyo Tech)

味覚は、食品中の化学物質が口腔内に存在する味蕾中の味細胞を活性化することにより生じる。５つの基本味（甘味・旨味・苦味・酸味・塩味）はそれぞれ異なる味細胞により受容される。味細胞の寿命は数週間であり、口腔内では絶えず新たな味細胞が作り出されている。これまで、転写因子 Skn-1a が甘味・苦味・旨味細胞および塩味細胞の発生・分化に関与することが明らかとなっているが、これら Skn-1a 系譜の味細胞がどのようにして細分化するのかという分子機構は不明である。本研究では、各味細胞の分化を制御する分子機構を明らかにするために、マウスの甘味細胞と苦味細胞のトランスクリプトームデータを用い、特定の味細胞にのみ発現する転写因子を同定することを試みた。甘味細胞に高頻度に発現する転写因子を見出すことはできなかったものの、Eyes absent 1 (Eya1)が甘味細胞に比べて苦味細胞に高頻度に発現していることを見出した。マウスの味蕾において二重 in situ hybridization により Eya1 を発現する細胞種を解析したところ、Eya1 は苦味細胞および未分化の味蕾細胞に特異的に発現することが明らかとなった。以上のことから、Eya1 は味細胞分化の比較的早い段階から発現し、苦味細胞の分化制御に関与している可能性が高いことが考えられる。

Taste substances are detected by taste receptor cells in the taste buds in the oral epithelium. Individual taste receptor cells contribute to evoking one of the five taste qualities: sweet, umami, bitter, sour, and salty (sodium) tastes. They are continuously replaced every few weeks by new ones generated from local epithelial stem cells. A POU transcription factor Skn-1a regulates the generation and differentiation of sweet, umami, bitter, and salty taste receptor cells. However, the molecular mechanisms underlying terminal differentiation into these Skn-1a-dependent taste receptor cells remain unknown. To identify the candidate molecules that regulate the differentiation of these taste receptor cells, we searched for the transcription factor genes expressed in a specific type of taste receptor cells using transcriptome data of taste receptor cells. Although no transcription factor gene showing higher expression in sweet cells than in bitter cells was found, Eyes absent 1 (Eya1) was identified as the only transcription factor gene showing higher expression in bitter cells than in sweet cells. In situ hybridization revealed that Eya1 was predominantly expressed in bitter cells and also in the putative immature/differentiating taste bud cells. Eya1 is a candidate molecule that regulates the generation and differentiation of bitter receptor cells.

taste receptor cell, bitter, differentiation

発表責任者：應本　真（mohmoto@bio.titech.ac.jp）

講演番号：4D04-11
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:30～ ミーティングルーム D

ヒト苦味受容体 hT2R14 の結晶構造解析に向けた試み

Crystallization of hT2R14 for structural analysis

○山出谷 拓海[1]、壇 淳[1]、水谷 公彦[1]、三上 文三[2]、林 由佳子[1] ([1]京大院農、[2]京大生存研)
○ Takumi YAMADEYA[1], Atsushi DAN[1], Kimihiko MIZUTANI[1], Bunzo MIKAMI[2], Yukako HAYASHI[1] ([1]Kyoto Univ. of Agric, [2]Kyoto Univ. of RISH)

【背景・目的】ヒトにおいて、苦味は 25 種類のヒト苦味受容体(hT2Rs)によって受容される。しかし、それぞれの苦味受容体が受容するリガンドの違いや受容機構はほとんど明らかになっていない。また、hT2Rs は他の臓器でも発現し、生理機能に関与することが報告されている。これらの事から、新規苦味抑制剤の探索や hT2Rs の医学・薬学的な利用のために、hT2Rs の立体構造を明らかにする事が求められる。しかし、hT2Rs のような膜タンパク質では、立体構造の解明に成功した例は極めて少ないのが現状である。そこで、本研究ではヒト苦味受容体の中で既知のリガンド数が最多の hT2R14 に着目し、単結晶を作成し、単結晶 X 線構造解析から立体構造を解明することを目的とした。【方法】*Saccharomyces cerevisiae* 発現系で発現・精製した hT2R14 を限外ろ過膜により置換・濃縮を行った。この際、リガンド添加し、hT2R14 の安定化を行った。このタンパク質溶液を用いて、シッティングドロップ法にて結晶化条件のスクリーニングを行った。さらにその条件を用いて、ハンギングドロップ法でより良質な結晶の作成を試みた。得られた結晶は、SPring-8 にて X 線回折実験を行い、構造解析を試みた。【結果・考察】結晶化の結果、単結晶や球晶のようなものが得られた。これらについて、SPring-8 での X 線回折実験の結果、いくつかの結晶でタンパク質結晶由来の回折点が見られた。しかし、分解能が不十分であり、構造解析を行うことはできなかった。そのため、現在は精製の際の純度の改善や、結晶化条件の再検討により、高品質結晶の獲得を目指している。

Background & purpose: In humans, bitterness is detected by 25 different bitter taste receptors (hT2Rs). However, little is known about the ligands and the binding mechanisms of each bitter taste receptor. Meanwhile, hT2Rs are expressed at other organs of the body and have been reported to be involved in physiological functions. Therefore, it is necessary to elucidate the steric structure of hT2Rs in order to search for new bitter taste inhibitors and to utilize hT2Rs for medical and pharmaceutical applications. However, there are very few successful cases about membrane proteins such as hT2Rs. In this study, we focused on hT2R14, which has the largest number of known ligands among human bitter taste receptors, and we attempted to generate single crystals of hT2R14. **Methods**: hT2R14 solution was optimized by using ultrafiltration membrane. Crystallization screening was performed by the sitting drop method and the hanging drop method. X-ray diffraction experiments were performed at SPring-8. **Results & discussion**: The crystals were thought to be derived from membrane proteins, but the resolution was not sufficient for structural analysis.

bitter taste receptor, crystallization, human

講演番号：4D04-12
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:30～ ミーティングルーム D

IgE ノックインマウスを用いたアレルギー性腸炎モデルのメタボローム解析

Metabolome analysis of allergic enteritis model using IgE knock-in mice

Zubeldia-Varela Elisa[1]、Blanco-Perez Frank[2]、○大澤 ひかり[3]、Villasenor Alma[1]、高橋 恭子[4]、Barber Domingo[1]、Vieths Stefan[2]、Perez-Gordo Marina[1]、Barbas Coral[1]、戸田 雅子[3]([1]Universidad San Pablo-CEU, CEU Univ.、[2]Paul-Ehrlich-Institut、[3]東北大農、[4]日大生物資源科学)
Elisa Zubeldia-Varela[1], Frank Blanco-Perez[2], ○ Hikari Osawa[3], Alma Villasenor[1], Kyoko Takahashi[4], Domingo Barber[1], Stefan Vieths[2], Marina Perez-Gordo[1], Coral Barbas[1], Masako Toda[3] ([1]Universidad San Pablo-CEU, CEU Univ., [2]Paul-Ehrlich-Institut, [3]Tohoku Univ., [4]Nihon Univ.)

アレルギー性腸炎は鶏卵や牛乳、大豆などの摂食によって起こる消化管アレルギーである。本研究はアレルギー性腸炎発症の分子メカニズムに関する知見を得ることを目的として、IgE を高発現する IgE knock in (IgEki)マウスを用いてメタボローム解析を行った。IgEki マウスに卵白食を摂食させると、卵白アレルゲン（OVA）特異的 IgE 産生と軽度の小腸炎発症が誘導される。そこで卵白食を投与した BALB/c 野生型マウス（コントロール群）と IgEki マウスの血清および糞便サンプルに含まれる代謝物を、質量分析装置（GC-MS や LC-MS、CE-MS）を用いて解析した。その結果、IgEki マウスのサンプルでは、Trimethylamine N-Oxide や 1,5-Anhydrosorbitol などの代謝物とともに、LysoPE(18:1)、LysoPC(14:0)、LysoPC(18:2)などのリゾリン脂質が有意に増加していた。リゾリン脂質がアレルギー性腸炎発症に及す影響を調べるために、ヒト大腸上皮細胞株(HT-29)を各種リゾリン脂質で刺激したところ、細胞死が誘導された。細胞死は Alarmin（細胞内容物）の放出を惹起し、これにより組織の炎症が誘導されることが知られている。以上より、アレルギー性腸炎発症時においては、リゾリン脂質が炎症惹起に関与することが示唆された。本研究で得られた知見はアレルギー性腸炎の予防や治療法の確立に貢献するものである。

Allergic entecoritis is a clinical phenotype of intestinal allergy mainly reacting to cow’s milk, soy or hen’s egg. This study aimed to elucidate a molecular mechanism for allergic entecoritis (AE) using IgE knock in (ki) mice expressing high levels of IgE by mean of metabolome analysis. IgEki mice produced IgE specific for ovalbumin (egg white allergen) and exhibited AE upon egg-white (EW) diet feeding. GC-MS, LC-MS and CE-MS analysis showed that, among many others, lysophospholipids (e.g., LysoPE(18:1), LysoPC(14:0), LysoPC(18:2)) were increased in serum and stool samples of IgEki mice, compared to those in BALB/c wild type mice (a non-allergic control). When a human colon epithelial cell line HT-29 were treated with such lysophospholipids, cell death was induced. It is known that damaged cells release alarmins (endogenous molecules derived from cells) and thereby triggers tissue inflammation. Taken together, our results suggested that lysophospholipids are involved in the development of AE by triggering cell death of epithelial cells. This study contributes to an establishment of novel strategy for prevention and treatment of AE.

allergic entecoritis, IgE, metabolome analysis

講演番号：4D04-13
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:30～ ミーティングルーム D

Lactobacillus plantarum 22A-3 の抗アレルギー効果と腸管免疫系への影響

Lactobacillus plantarum 22A-3 attenuates allergic response and affects intestinal immune system

○榎田 麻里[1]、大戸 信明[2]、栗原 浩誠[2]、水野 雅史[1]（[1]神戸大院農、[2]丸善製薬株式会社）
○Mari ENOKIDA[1], Nobuaki OHTO[2], Hiroshige KUWAHARA[2], Masashi MIZUNO[1]（[1]Kobe Univ., [2]Maruzen Pharmaceuticals Co., Ltd.）

【背景・目的】本研究室ではこれまでに *Lactobacillus plantarum* 22A-3（LP22A-3）が、受動皮膚アナフィラキシー反応試験において、TGF-β 産生を介して肥満細胞の活性化を抑制することを明らかにした。本研究では、卵白アルブミン（OVA）誘導性食物アレルギーマウスモデルを用いた LP22A-3 の抗アレルギー作用の評価、免疫系に与える影響の検討を目的とした。
【方法】雌性 5 週齢 BALB/c マウスに 10 μg の OVA と $Al(OH)_3$ を混合したものを腹腔内投与して感作させ、10 mg の OVA を複数回経口投与して腸管を刺激した後、100 mg の OVA を経口投与することでアレルギーを誘導した。アレルギー重症度の指標として、血中総 IgE 量の定量、直腸温度の測定、下痢やアナフィラキシー症状の評価を行った。なお、試験期間中には 1×10^8 CFU の LP22A-3 を毎日経口投与した。試験終了後には、小腸を回収して RNA 抽出を行い、RT-PCR 法を用いて制御性 T（Treg）細胞の転写因子である Foxp3 mRNA 発現量を測定した。
【結果・考察】LP22A-3 経口投与により、アレルギー感作状態における血中の総 IgE 量の上昇が有意に抑制された。また LP22A-3 を投与したマウスでは、100 mg OVA 経口曝露時の直腸温度の低下が有意に抑制され、下痢症状・アナフィラキシー症状の緩和が見られた。よって、LP22A-3 は食物アレルギー症状を抑制できる可能性が示唆された。さらに、小腸において Treg 細胞の転写因子である Foxp3 mRNA 発現量が有意に増加していたことから、現在は LP22A-3 が免疫系に与える影響を検討中である。

Previous reports showed that *Lactobacillus plantarum* 22A-3 (LP22A-3) was able to inhibit mast cells degranulation through TGF-β secretion in a passive cutaneous anaphylaxis reaction. In this study, we examined the effect of LP22A-3 on OVA-induced food allergic response and immune system. BALB/c mice were sensitized with intraperitoneal injections of 10 μg OVA mixed with an adjuvant. Food allergy was induced by five times oral administrations of 10 mg OVA, followed by 100 mg OVA. Oral administration of LP22A-3 suppressed the increase in total IgE levels in blood, the decrease of rectal temperature and diarrhea induced by orally challenged with 100 mg OVA. These results suggested that LP22A-3 was able to attenuate OVA-induced food allergic response. In this research, LP22A-3 was found to significantly increase the mRNA expression of Foxp3, regulatory T cells transcription factor, in small intestine. Further research is ongoing to determine the detailed mechanism of LP22A-3 on the immune system.

anti-allergic effect, *Lactobacillus plantarum*, regulatory T cell

講演番号：4D04-14
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:30～ ミーティングルーム D

アレルギーモデルマウスにおける 4,8-スフィンガジエニン立体異性体の抗アレルギー活性

Anti-allergic activity of 4,8-sphingadienine stereoisomers in allergy model mice

○清水 遥河[1]、中村 逸揮[1]、久世 雅樹[1]、大戸 信明[2]、栗原 浩誠[2]、水野 雅史[1]([1]神戸大院農、[2]丸善製薬株式会社)
○ Haruka SHIMIZU[1], Ikki NAKAMURA[1], Masaki KUSE[1], Nobuaki OHTO[2], Hiroshige KUWAHARA[2], Masashi MIZUNO[1] ([1]Kobe Univ., [2]Maruzen Pharmaceuticals Co., Ltd.)

【目的】本研究室ではパイナップル由来グルコシルセラミド分解産物であるセラミドが肥満細胞上の白血球単一免疫グロブリン様受容体 (LMIR) 3 を介して脱顆粒を抑制することで、I 型アレルギー反応を抑制することを明らかにした。本研究ではセラミド中成分である 4,8-スフィンガジエニン (SD) の立体異性の違いが肥満細胞活性化抑制効果に与える影響を評価することを目的とした。
【方法】4 位、8 位不飽和結合における立体異性の組み合わせが異なる 4 種の 4,8-SD 立体異性体のアレルギー抑制効果を評価した。*in vivo* 実験では、受動皮膚アナフィラキシー (PCA) マウスモデルを用いた。雌性 4 週齢 BALB/c マウスの耳介に各種 4,8-SD を皮内投与し、2 時間後抗 TNP-IgE を尾静脈内投与し、さらに 30 分後抗原であるピクリルクロライドを耳介に塗布した。抗原塗布前と塗布 2 時間後の耳介厚の差から耳の浮腫を算出し、アレルギー反応の指標とした。*in vitro* 実験では、各種 4,8-SD をラット好塩基球様細胞 RBL-2H3 細胞に直接添加し、2 時間後抗 TNP-IgE で感作し、さらに 4 時間後 TNP-BSA により脱顆粒を誘導した。RBL-2H3 細胞から放出される β-hexosaminidase 活性を測定し、脱顆粒反応の指標とした。
【結果】PCA 実験において、4 位不飽和結合が *cis* 体の 4,8-SD を耳介に皮内投与することにより耳介浮腫が有意に抑制されたが、4 位不飽和結合が *trans* 体の 4,8-SD における抑制効果は小さかった。さらに、RBL-2H3 細胞に 4 位不飽和結合が *cis* 体の 4,8-SD を添加すると、脱顆粒は有意に抑制されたが、4 位不飽和結合が *trans* 体の 4,8-SD は脱顆粒を抑制しなかった。現在は 4,8-SD の LMIR3 への親和性を評価するなど、4,8-SD による肥満細胞活性化抑制機序を検討している。

Recent studies have suggested that ceramide, one of the metabolites of glucosylceramide derived from pineapple, inhibited mast cell degranulation via leukocyte mono-immunoglobulin-like receptor (LMIR) 3. It was well known that ceramide is finally metabolized to 4,8-sphingadienine. However, there is no report on the effect of the metabolite on mast cell degranulation. In this study, we investigated the *cis/trans* stereoisomeric-dependent inhibitory effects of 4,8-sphingadienines (SD) on mast cell activation. Intradermal administration of *cis*-4-*trans*-8-, and *cis*-4-*cis*-8-SD ameliorated ear edema in passive cutaneous anaphylaxis reaction. In addition, 4,8-SD stereoisomers differentially suppressed degranulation of RBL-2H3 cells in an *in vitro* model. Further research on the effect of 4,8-SD stereoisomers on LMIR3-mediated signaling is ongoing to clarify anti-allergic mechanisms.

4,8-sphingadienine, stereoisomer, mast cell

講演番号：4D04-15
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:30～ ミーティングルーム D

煮干し酵素分解エキスの脱顆粒抑制効果に関する研究

Studies on degranulation inhibitory effect of enzyme-treated dried sardines extract

○平川 泰己、西 甲介、石田 萌子、菅原 卓也（愛媛大院農）
○Taiki HIRAKAWA, Kosuke NISHI, Momoko ISHIDA, Takuya SUGAHARA (Ehime Univ.)

近年、花粉症などのアレルギー患者が増加しており、大きな社会問題となっている。抗アレルギー薬は副作用を伴うことが多く、抗アレルギー効果のある食品の摂取による症状改善に大きな期待が寄せられている。煮干しはイワシなどの小魚を茹で、乾燥させた水産加工品で、カルシウムや DHA などの機能性成分とうま味成分を含み、古くから出汁の材料として利用されてきた。これまでの研究で、煮干しを酵素処理して得られたエキス（EDSE）に、ラット好塩基球細胞株 RBL-2H3 細胞の抗原誘導性脱顆粒反応を抑制することを発見した [1)]。そこで、本研究では EDSE 中の活性物質の解明を目的とした。まず、活性物質の分子サイズを検討した結果、推定される分子量は 100 以上 3500 未満であった。また、EDSE の活性は、100℃、15 分の加熱処理に対しても安定であることが確認された。続いて、活性物質の特定を試みた。まず夾雑物除去のため、EDSE に 4 倍量のアセトニトリルを添加し、沈殿と上清に分けて活性評価した結果、上清画分に強い活性が認められた。これを逆相クロマトグラフィーで分画した結果、活性物質はカラムの非吸着画分（アセトニトリル 0%）に溶出された。これらの結果より、EDSE に含まれる抗アレルギー物質は熱安定で、両親媒性の低分子であることが推察された。

1) Awane *et al.* ***RSC Adv.*** , 2016, **6**, 85718-85726

In recent years, the number of patients with allergy, such as pollinosis, has been increasing, which is a social problem. Allergy is a disease that causes unusual immune response against any particular substances, and functional foods are expected to prevent it. Dried small sardines are the marine product made by boiling and drying sardines. In our previous study, it was revealed that an enzyme-treated dried sardines extract (EDSE) has the anti-allergic effect on rat basophil leukemia cell line RBL-2H3 cells [1)]. In this study, we tried to identify the active substance in EDSE. The molecular weight of the active substance in EDSE ranged from 100 to 3500. The activity of EDSE was stable against heat treatment at 100˚C for 15 min. After mixing EDSE with acetonitrile, the active substance was collected in the supernatant of 80% acetonitrile. After applying the 80% acetonitrile supernatant fraction to the reversed-phase chromatography, the active substance was eluted in the non-adsorbed fraction at 0% acetonitrile. It was supposed that the active substance is amphipathic small molecule with heat-stability.

1) Awane *et al.* ***RSC Adv.*** , 2016, **6**, 85718-85726

Enzyme-treated dried sardines extract, degranulation, functional food material

講演番号：4E01-01
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:00～ ミーティングルーム E

新規食品機能性成分ナス由来コリンエステル（アセチルコリン）の血圧改善効果と抗高血圧作用メカニズム

The blood pressure improvement by eggplant derived cholineester (acetylcholine) and the antihypertensive mechanism

○山口 翔平[1]、早坂 柚実[2]、鈴木 美穂[2]、小山 正浩[3]、椿 和文[4]、西村 三恵[5]、西平 順[5]、中村 浩蔵[1,2,6]([1]信州大院総合医理工、[2]信州大院総合理工、[3]株式会社ウェルナス、[4]株式会社 ADEKA、[5]北海道情報大学、[6]信州大農)

○Shohei YAMAGUCHI[1], Yuzumi HAYASAKA[2], Miho SUZUKI[2], Masahiro KOYAMA[3], Kazufumi TSUBAKI[4], Mie NISHIMURA[5], Jun NISHIHIRA[5], Kozo NAKAMURA[1,2,6] ([1]Graduate School of Med. Sci. Tech., Shinshu Univ., [2]Graduate School of Sci. Tech., Shinshu Univ., [3]Wellnas Co., Ltd, [4]ADEKA Co., [5]Hokkaido Information Univ., [6]Shinshu Univ.)

【背景】我々は抗高血圧食品の有効成分としてアセチルコリン（ACh）を単離し、ナス（*Solanum melongena*）に ACh が豊富に含まれることを明らかにした。ナスは新規な食品機能性成分ナス由来コリンエステル（ACh）を関与成分とする機能性野菜としての利用が期待される。本演題では臨床試験によるナス摂取の血圧改善効果および動物試験による経口投与 ACh の抗高血圧作用機序を発表する。
【方法】臨床試験：ストレスを感じている血圧が高めの日本人成人男女 100 名を対象にプラセボ対照ランダム化二重盲検並行群間比較試験を実施した。被験食品として ACh2.3 mg/人・日を含むナス粉末含有カプセルを 12 週間毎日摂取させた。来所時血圧（主要評価項目）および家庭血圧（副次評価項目）を経時的に測定した。動物試験：SHR への ACh の反復および単回経口投与による血圧、交感神経活動への影響をテレメトリー法により、生体の昇圧系への影響を昇圧物質の定量により調査した。
【結果】臨床試験：ナス粉末摂取により全被験者において来所時拡張期血圧（8 週）、来所時収縮期血圧（12 週）、家庭起床時収縮期および拡張期血圧（4 週）の有意な低下が認められた[1]。動物試験：ACh の経口投与は SHR の血圧を慢性的に低下させ、交感神経活動抑制および昇圧物質の低下がみられた。本研究によりヒトに対する血圧改善効果がナスの食品機能性として世界で初めて実証され、その作用メカニズムとして、ACh が交感神経活動抑制により昇圧系を抑制することが明らかとなった。ナス由来コリンエステル（ACh）は交感神経活動を抑制することで、血圧が高めの人の血圧を効果的に改善したと考えられる。本研究は農研機構生研支援センター「革新的技術開発・緊急 展開事業（うち経営体強化プロジェクト）」の支援を受けて実施した。

We defined that acetylcholine (ACh) was an antihypertensive food ingredient, and eggplant (*Solanum melongena*) contained abundant ACh. In this study, we presented the blood pressure improvement by daily ingestion of eggplant powder on stressed subjects with higher blood pressure [1] and the antihypertensive mechanism demonstrated using telemeterized spontaneously hypertensive rat (SHR). The orally administered ACh inhibited sympathetic nervous activity and suppressed vasomotor systems on SHR. In the stressed subjects with higher blood pressure, their sympathetic nervous activity was possibly inhibited by ACh derived from eggplant, and then blood pressure was effectively improved.

[1] Nishimura, M., et al, (2019) *Nutrients*, 11, 2797.

eggplant, acetylcholine, blood pressure

発表責任者：中村浩蔵（knakamu@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：4E01-02
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:00～ ミーティングルーム E

新規食品機能性成分ナス由来コリンエステル（アセチルコリン）を関与成分とした世界初のナス機能性表示サプリメント

The novel supplement with functional claim of eggplant containing eggplant-derived acetylcholine

○小山 正浩[1]、鈴木 美穂[2]、野澤 周吾[2]、山口 翔平[3]、椿 和文[4]、中村 浩蔵[2,3,5]([1]株式会社ウェルナス、[2]信州大院総合理工、[3]信州大院総合医理工、[4]株式会社 ADEKA、[5]信州大農)
○Masahiro KOYAMA[1], Miho SUZUKI[2], Shugo NOZAWA[2], Shohei YAMAGUCHI[3], Kazufumi TSUBAKI[4], Kozo NAKAMURA[2,3,5] ([1]Wellnas. Co., Ltd, [2]Graduate School of Sci. Tech., Shinshu Univ., [3]Graduate School of Med. Sci. Tech., Shinshu Univ., [4]ADEKA Co., [5]Shinshu Univ.)

ナス（*Solanum melongena*）は日本の主要農産物の一つであるが、近年その需要が低迷し全国のナス生産量は減少している。その理由に、ナスの食品機能性が見出されていない点と、加工用途が少なく廃棄品が多い点が挙げられる。昨年、プラセボ対照ランダム化二重盲検並行群間比較試験を実施し、ナス由来コリンエステル（アセチルコリン）2.3mg/日を含むナス粉末の継続摂取がストレスを感じている正常血圧者及びⅠ度高血圧者の血圧および心理状態を有意に改善することを明らかにし、ナスの食品機能性を世界で初めて実証した[1]。有効成分のアセチルコリンは新規な食品機能性成分であり、ナスに他の農産物の約 3000 倍含まれることも分かった[2]。これらの成果を基に、我々は、未利用廃棄ナスを原料に、ナス由来コリンエステル（アセチルコリン）を関与成分とした、世界で初めてのナス機能性表示サプリメントを開発したので発表する。

臨床試験結果を報告した論文[1]を科学的根拠として、試験食品に用いたものと同一とみなせるナス搾汁粉末カプセルを最終製品として消費者庁に届け出た。臨床試験結果確定から 8 ヵ月余りで論文が受理され、約 1 ヵ月で初回届出を行い、2 度の修正を経て 7 月 20 日に機能性表示食品として受理された。(届出番号 F129、食品区分：加工食品（サプリメント形状)、関与成分：ナス由来コリンエステル（アセチルコリン)、関与成分含有量：2.3mg/日、機能性表示：本品にはナス由来コリンエステル（アセチルコリン）が含まれるので、血圧が高めの方の血圧（拡張期血圧）を改善する機能があります。)。このサプリメントは 1 日 4 カプセルの摂取で効果が期待できる。ナス由来コリンエステル（アセチルコリン）は、Ｍ３型ムスカリン性アセチルコリン受容体を介して自律神経に働きかけ、交感神経抹消からのカテコールアミン類（アドレナリン、ノルアドレナリン）の放出を抑制して拡張期血圧を改善すると推定される[3]。本内容は農研機構生研支援センター「革新的技術開発・緊急 展開事業（うち経営体強化プロジェクト)」の支援を受けて実施した。

We demonstrated the blood pressure improvement by daily ingestion of eggplant powder containing 2.3 mg/day acetylcholine in randomized controlled trial [1], and the eggplant powder was approved as a food with functional claims. This product is the first case that eggplant is treated as a nutraceutical food with a novel functional food ingredient.

[1] Nishimura et al., (2019) *Nutrients*, 11, 2797. [2] Wang et al., (2020) *Foods*, 9, 1029. [3] Yamaguchi et al., (2019) *Food Chem.*, 276, 376.

eggplant, acetylcholine, food with functional claim

発表責任者：小山正浩（mkoyama32@wellnas.biz）

講演番号：4E01-03
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:00～ ミーティングルーム E

システマティックレビューによるナス由来コリンエステル（アセチルコリン）を関与成分とした機能性表示生鮮ナスおよびナス漬物の開発

Development of fresh eggplant and pickled eggplant with functional claim containing eggplant-derived acetylcholine by systematic review

中村 浩蔵[1,3,4]、○小山 正浩[2]、鈴木 美穂[3]、野澤 周吾[3]、山口 翔平[4]、冨田 邦彦[5]、豊永 明男[6]([1]信州大農、[2]株式会社ウェルナス、[3]信州大院総合理工、[4]信州大院総合医理工、[5]三井食品工業株式会社、[6]高知県農業協同組合)

Kozo NAKAMURA[1,3,4], ○ Masahiro KOYAMA[2], Miho SUZUKI[3], Shugo NOZAWA[3], Shohei YAMAGUCHI[4], Kunihiko TOMITA[5], Akio TOYONAGA[6] ([1]Shinshu Univ., [2]Wellnas. Co., Ltd, [3]Graduate School of Sci. Tech., Shinshu Univ., [4]Graduate School of Med. Sci. Tech., Shinshu Univ., [5]MITSUI SYOKUHIN KOGYO CO.,LTD., [6]KOCHI PREFECTURAL AGRICULTURAL COOPERATIVES)

我々は、ナス由来コリンエステル（アセチルコリン）を含むナス粉末の継続摂取がストレスを感じている血圧が高めの人の血圧および心理状態を有意に改善することを明らかにし、ナスの食品機能性を世界で初めて実証して論文を公表[1]、この成果をもとにナス機能性表示サプリメントを開発した。その後、ナス機能性に関するシステマティックレビュー（SR）を実施してナスの血圧改善効果を評価し、新たなナスの機能性表示食品として生鮮ナスおよび漬物ナスを開発したので発表する。

SR では、PubMed、医中誌 Web、J-DreamⅢをデータベースに用いた。9 報の関連文献を特定し、一次スクリーニングで 7 報を除外した。残り 2 報を二次スクリーニングで精査し、1 報を採用した。採用文献では、血圧が高めの日本人成人を対象に、届出製品と同じ関与成分と摂取量によるプラセボ対照ランダム化二重盲検並行群間比較試験が実施されており、届出製品の摂取による血圧改善効果の科学的根拠として採用できると判断された。SR の結果をもとに両製品を消費者庁に届出し、2020 年 9 月 11 日に機能性表示食品として受理された。【生鮮ナス】届出番号：F311、食品区分：生鮮食品。【ナス漬物】届出番号：F312、食品区分：加工食品（その他）。【共通】関与成分：ナス由来コリンエステル（アセチルコリン）、関与成分含有量：2.3mg/日、機能性表示：「本品にはナス由来コリンエステル（アセチルコリン）が含まれます。ナス由来コリンエステル（アセチルコリン）には血圧が高めの方の血圧（拡張期血圧）を改善する機能があることが報告されています。」。これらの商品の機能性は、ナス由来コリンエステル（アセチルコリン）が自律神経に働きかけて昇圧物質の放出を抑制することで引き起こされると推定される[2]。様々な形態のナス機能性表示食品を展開し選択肢を増やすことで消費者の利便性向上および機能性野菜ナスの消費量増加が期待される。本内容は農研機構生研支援センター「革新的技術開発・緊急 展開事業（うち経営体強化プロジェクト）」の支援を受けて実施した。

We investigated the blood pressure improvement about fresh and pickled eggplant containing acetylcholine which was novel antihypertensive food ingredient by systematic review (SR). The SR provided the scientific evidence that the ingestion of eggplant product containing 2.3 mg/day acetylcholine improved blood pressure in subjects with higher blood pressure. Based on the result, their eggplant products were approved as food with functional claims.

[1] Nishimura et al, (2019) *Nutrients*, 11, 2797. [2] Yamaguchi et al., (2019) *Food Chem.*, 15, 376.

eggplant, acetylcholine, food with functional claim
発表責任者：小山正浩（mkoyama32@wellnas.biz）

講演番号：4E01-04
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:00～ ミーティングルーム E

腸管におけるオレアミドの吸収機構

The mechanism of oleamide absorption in the intestinal tract

○小林 恭之[1]、渡辺 夏美[1]、杉本 圭一郎[2,3]、室田 佳恵子[4]、甲斐 建次[1]、原田 直樹[1]、乾 博[5]、山地 亮一[1] ([1]大阪府・大学院・生命環境、[2]長岡香料、[3]大阪府大・生資セ、[4]島根大・生物資源、[5]大阪府大・栄養)

○Yasuyuki Kobayashi[1], Natsumi Watanabe[1], Keiichiro Sugimoto[2,3], Kaeko Murota[4], Kenji Kai[1], Naoki Harada[1], Hiroshi Inui[5], Ryoichi Yamaji[1] ([1]Osaka Prefecture Univ., [2]NAGAOKA CO., [3]Osaka Prefecture Univ. Center for Research, [4]Shimane Univ., [5]Osaka Prefecture Univ. Nutr.)

【目的】オレアミド（*cis*-9-octadecenamide）は食品成分として体内に摂取される脂肪酸アミドである。我々は、マウスにおいてオレアミドの経口摂取が行動範囲を制限して飼育することで誘発される筋萎縮を抑制することを見出した[1)]。しかし経口摂取したオレアミドの吸収機構は不明である。本研究では、安定同位体オレアミドを用いてオレアミドの吸収機構を明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】小腸上皮モデル Caco-2 細胞をトランスウェルにて安定同位体オレアミド存在下で培養した結果、安定同位体オレアミドは Caco-2 細胞へと取り込まれ、その取り込みは脂肪酸輸送体 CD36 の阻害剤によって抑制された。一方、細胞内と下層のオレアミド量は培地中で減少したオレアミド量の約 1/50 だったことから、細胞内へと取り込まれた安定同位体オレアミドの大部分が代謝されると推測された。そこで安定同位体オレアミドと脂肪酸アミド分解酵素 FAAH の阻害剤の共存下で Caco-2 細胞を培養したところ、細胞内の安定同位体オレアミド量が顕著に増加した。さらにリンパ管にカニュレーションしたラットの十二指腸に安定同位体オレアミドを投与した結果、安定同位体オレアミドはリンパ液中で検出された。以上の結果より、オレアミドは腸管において、おそらく CD36 を介して小腸上皮細胞内へと取り込まれた後、細胞内で FAAH により大部分が代謝されるが、一部はリンパ管へと輸送されることが明らかとなった。

【Objectives】Oleamide (*cis*-9-octadecenamide) is a fatty acid amide that is ingested exogenously as a food ingredient. We have found that orally administered oleamide rescues muscle atrophy in mice. However, the absorption mechanism of orally administered oleamide is unclear. In this study, we studied the absorption mechanism of oleamide using the stable isotope-labeled oleamide.

【Methods and Results】To evaluate the absorption of oleamide using Caco-2 cells as a model of the small intestinal epithelium, Caco-2 cells were cultured in the presence of stable isotope-labeled oleamide. The stable isotope-labeled oleamide was absorbed into Caco-2 cells and the inhibitor of the fatty acid transporter CD36 inhibited its absorption. The stable isotope-labeled oleamide markedly accumulated in the cells in the presence of the inhibitor of fatty acid amide hydrolase. Next, we examined the lymphatic transport of oleamide using lymph-cannulated rat. The stable isotope-labeled oleamide administered into the duodenum was detected in the lymphatic fluid. These results indicate that oleamide is absorbed into the cells, perhaps via CD36, most of which is intracellularly metabolized by FAAH, but some is transported into the lymphatic vessels.

1) Kobayashi *et al., Br. J. Nutr.* in press

oleamide, intestinal absorption, lymphatic transport

講演番号：4E01-05
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:00～ ミーティングルーム E

シソ科植物に含まれるロスマリン酸とその代謝物のマウスにおける体内分布

Tissue distribution of rosmarinic acid and its metabolites in mice.

○小松澤 里帆[1]、平 修[2]、岡田 憲典[3]、阿部 啓子[1,4]、山田 正仁[5]、小林 彰子[1]([1]東大院農、[2]福大農、[3]東大生セ、[4]産技総研、[5]金沢大院医)
○Riho KOMATSUZAWA[1], Shu TAIRA[2], Kazunori OKADA[3], Keiko ABE[1,4], Masahito YAMADA[5], Shoko KOBAYASHI[1] ([1]Univ. of Tokyo., [2]Fukushima Univ., [3]Tokyo Univ., [4]KISTEC, [5]Kanazawa Univ.)

我々は、シソ科植物に含まれるポリフェノールの 1 種であるロスマリン酸（RA）を約 1 年間摂食させたアルツハイマー病（AD）モデルマウスにおいて、AD の主病態であるアミロイドβおよびリン酸化タウの沈着を抑制し、認知機能を改善する効果を見出した。しかし、RA 経口摂取後の体内分布は明らかにされておらず、詳細な作用機構は不明である。本研究では、RA（60 mg/kg BW）をマウスに単回経口投与し、経時的な体内分布を明らかにした。血漿、脳、肝臓、腎臓、脾臓、肺、小腸に含まれる RA、およびその代謝物であるカフェ酸（CAA）、フェルラ酸（FA）、クマル酸、ヒドロ-*m*-クマリン酸、ロスマリン酸メチル（RM）を LC-MS/MS を用いて測定した。血漿中では RA、CAA、FA のみが検出され、RA 濃度が最も高かった。脳では RA が検出されなかった一方、抱合化された CAA、FA のみが投与 15 分後から検出された。肝臓や腎臓では RA、CAA、FA、RM が検出され、RM が最も高濃度に検出された。以上の結果から、RA は経口摂取後代謝され、肝臓、腎臓では主に RM、脳では CAA 及び FA として存在していることが明らかとなった。現在、イメージング質量分析により CAA 及び FA の脳内分布を解析中であり、上記内容とその解析結果について発表する予定である。

Previously we reported that one-year *per os* administration of rosmarinic acid (RA) to Alzheimer's disease (AD) model mice resulted in decreased amyloid-β aggregation and phosphorylated tau levels in the brain. The RA-fed group also showed improvement in cognitive function. However, the molecular mechanism of their evens remined unclear. The purpose of this study was to elucidate the tissue distribution of RA and its metabolites after oral RA intake. We measured levels of RA and its metabolites: caffeic acid (CAA), ferulic acid (FA), *m*-hydroxycinnamic acid, *m*-hydroxyphenylpropionic acid, and methyl rosmarinate (RM) in organs using Liquid chromatography - mass spectrometry (LC-MS/MS) after the oral administration of RA. RA, CAA, and FA were detected in plasma, with RA being present at the highest concentration. RA was not detected in the brain, although glucuronide- and sulfate- conjugated CAA and FA were detected in the brain from 15 min after RA administration. RA, CAA, FA, and RM were detected in the liver and kidney, with RM being present at the highest concentration. Our data suggest that RA is metabolized after its oral administration, with RM being mainly present in the liver and kidney, and CAA and FA in the brain. We are currently analyzing the distribution of CAA and FA in the brain using imaging MS.

Pharmacokinetics, Rosmarinic acid, Alzheimer's disease

発表責任者：小松澤里帆（kriho@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：4E01-06
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:00～ ミーティングルーム E

活性酸素に応答し、抗酸化物質を放出するグルカンナノキャリアー
Glucan nanocarriers releasing antioxidants by reacting with active oxygen species

○土居 菜々子、甲元 一也（甲南大 FIRST）
○NANAKO DOI, KAZUYA KOUMOTO (Konan Univ.)

ビタミン類、カロテノイド類、ポリフェノール類は抗酸化活性を有し、サプリメントや化粧品に機能成分として配合されている。しかしながら、その多くは水への溶解性が低く、バイオアベイラビリティの低さが問題点となってきた。そのため、ミセルやリポソーム用いた可溶化や、シクロデキストリンに包接させるなど、その溶解性を向上させる研究が行われてきた。我々の研究室ではβ－１，３－１，６－グルカンのコンフォメーションを変性させ、ナノ粒子としたｒ-グルカン包接分散法を開発した。その手法でクルクミン、レスベラトロール、カテキン、レチノイン酸を包接した複合体に抗酸化活性が発現することを昨年の年次大会にて報告した。しかし、他の抗酸化物質の包接や抗酸化活性の評価、さらに抗酸化活性発現のメカニズムについては評価を行えていなかった。そこで本研究では、他の抗酸化物質の包接可溶化及び抗酸化活性発現のメカニズムについての検討を行った。新たに用いたイソフラボン、カフェイン酸、ケルセチン、レチノールもｒ-グルカンに包接され、それらの包接複合体にもこれまでの複合体と同様の抗酸化活性が発現することが確認された。さらに、そのメカニズムを評価したところ、抗酸化活性を示すｒ-グルカンは活性酸素と反応して多糖鎖が切断され、包接された抗酸化物質の放出が促進されることが明らかになった。講演では、得られている一連の結果について報告する。

Solubilization of antioxidants, showing antioxidant activity is important for their application to functional foods and cosmetics. We recently reported a unique solubilization method for poorly water-soluble molecules using renatured β-1,3-1,6-glucan nanoparticles (NPs). At last conference, we reported that r-glucan can incorporated antioxidants (curcumin, resveratrol, catechin, and retinoic acid) and the complexes shows antioxidant activity. In this study, we investigated the applicability to other antioxidants and the antioxidant mechanism.

As a result, not only curcumin, resveratrol, catechin, and retinoic acid but also other antioxidants (isoflavone, caffeic acid, quercetin, retinol) can be included in the r-glucan NPs. Furthermore, it was revealed that active oxygen species cleave the glucan main chains and facilitate the release of the antioxidant incorporated.

β-1,3-1,6-glucan, Antioxidant, Active Oxigen

発表責任者：甲元一也（koumoto@konan-u.ac.jp）

講演番号：4E01-07
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:00～ ミーティングルーム E

メルローワインおよびその残渣に含まれる成分のアンチエイジング効果

Anti-aging Effects of Constituents in Merlot Wine and its Compression Residue

○田中 文人[1]、澤邊 昭義[1]、山盛 拓馬[1]、竹田 竜嗣[2]、岸本 賢治[3]([1]近畿大農、[2]関西福祉科学大健康福祉、[3]株式会社ハーベリィアーズストーリー)
○ Ayato Tanaka[1], Akiyoshi Sawabe[1], Takuma Yamamori[1], Ryuji Takeda[2], Kenji Kishimoto[3] ([1]Faculty of Agriculture, Kindai University, [2]Graduate School of Engineering, Osaka City University, [3]Herbery Earth Story Inc., Ltd.)

糖化反応は食品中のみならず，生体内に存在する糖質とタンパク質間でも進行する．生体内で糖化の後期段階が行われると AGEs が生成される．AGEs は皮膚タンパクの変性（架橋構造が形成することによりシミ，シワの原因となる），内臓をはじめとする体内組織に作用して，病気につながることが知られている．また近年では老化の原因の一つとして考えられている．このように糖化反応はさまざま原因となることから，本研究では抗糖化に着目し，化粧品や健康食品への有効利用が期待できる抗糖化作用物質の探索を行った．抗糖化作用評価として，AGEs (advanced glycation end products) 生成阻害試験を行った．今回，メルローワインと圧搾残渣に含まれる物質の化学構造や活性の違いについても検討する．

メルローワイン圧搾残渣の Hexane 抽出物から 1 種，1-BuOH 抽出物から 4 種，水相部から 1 種の合計 6 種の化合物が単離された．また，メルローワインから 2 種の化合物が単離された．

単離した化合物の AGEs 生成阻害活性を測定し，IC50 値を計算した．その結果，いずれの化合物もポジティブコントロールとしての aminoguanidine より高い AGEs 生成阻害活性を示した．

以上のことより，メルローのワイン圧搾残渣は高い AGEs 生成阻害活性効果を有するため，化粧品素材または食品添加物への利用が見込まれる。

Glycation, which is a non-enzymatic reaction between reducing sugars and amino groups in proteins, takes place in food as well as the human body. In the human body, glycation forms AGEs (advanced glycation end products), which affect proteins including body tissue. It was recently reported that the formation and accumulation of AGEs are associated with one of the key factors of aging. Therefore, we examined the anti-aging effects (AGE inhibitory activity) of the constituents in Merlot wine and its compression residue. Eight compounds were isolated from Merlot wine and its compression residue, and their structures were established on the basis of MS and NMR spectroscopy. In conclusion, Merlot wine compression residue may be used as food additive or cosmetics because it exhibited remarkable AGE inhibitory activity.

Anti-aging Effects, AGE inhibitory activity, Merlot Wine and its Compression Residue

発表責任者：澤邊昭義（sawabe@nara.kindai.ac.jp）

講演番号：4E01-08
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:00～ ミーティングルーム E

カルボニルストレスが腎うっ血により惹起される腎障害に与える影響の解析

Scavenge of carbonyl stress could suppress renal injury induced by renal congestion.

○大崎 雄介[1]、高橋 知香[2]、伊藤 貞嘉[3]、白川 仁[1]、森 建文[2]([1]東北大・院農・栄養学、[2]東北医科薬科・腎内、[3]東北大・院医・腎高内)
○Yusuke OHSAKI[1], Chika TAKAHASHI[2], Sadayoshi ITO[3], Hitoshi SHIRAKAWA[1], Takefumi MORI[2] ([1]Lab Nutrition, Dept. of agricultural science, Tohoku Univ, [2]Tohoku medical and pharmaceutical univ., [3]Graduate school of medicine, Tohoku Univ.)

【背景】うっ血性心不全による腎機能低下機序の一端に、腎静脈血のうっ滞を介した虚血の関与が示唆される。カルボニルストレスの低減は腎虚血再灌流による機能低下を改善させる報告があるが、腎うっ血におけるカルボニルストレスの影響は十分に解明されていない。本検討ではカルボニルストレスの一種であるメチルグリオキサールを消去するグリオキシラーゼ 1(GLO1)過剰発現ラットを用いて、腎うっ血による腎障害対するカルボニルストレスの影響の解明を試みた。
【方法】Wistar 系雄性 GLO1-tg ラット、ならびに同腹仔の野生型(WT)ラットの左腎静脈を麻酔下にて内空幅 0.20mm のシルバークリップにより狭窄させ、片側腎うっ血モデルとした。2 週間の飼育後に左右腎を摘出し、腎皮質領域の障害マーカーを RT-PCR 法により評価した。
【結果】腎線維化マーカー(TGF-β: トランスフォーミング増殖因子-β, FN: フィブロネクチン)、尿細管障害マーカー(OPN: オステオポンチン、NGAL: 好中球ゼラチナーゼ結合性リポカリン、KIM-1: 腎損傷分子-1)、ならびに炎症マーカー(TNF-α: 腫瘍壊死因子-α、MCP-1: 単球遊走促進因子-1)の mRNA 発現は、正常腎である右腎と比較して、うっ血腎である左腎において有意に上昇した。またこれらの mRNA 発現は野生型ラット左腎と比較して GLO1-tg ラットの左腎において有意に低下した。
【結語】カルボニルストレスは腎うっ血により生じる腎障害を増悪させる可能性が示された。

[INTRODUCTION] Renal ischemia mediated by renal congestion is suggested as one of the pathogenesis of renal injury due to congestive heart failure. Since transgenic (tg) rats overexpressing glyoxalase 1 (GLO1) that scavenges methylglyoxal, one of the carbonyl stresses, has been reported to improve functional decline due to renal ischemia-reperfusion, we attempted to elucidate the effect of carbonyl stress on renal injury induced by renal congestion using GLO1-tg rats. [METHODS] The left renal veins of Wistar male GLO1-tg rats and littermates of wild-type (WT) rats were occluded with a silver clip (0.20 mm inner space width) to prepare a model of unilateral renal congestion under anesthesia. After 2 weeks, the left and right kidneys were removed and the mRNA expression of renal injury markers were evaluated by RT-PCR. [RESULTS] The renal cortical mRNA expression levels of renal fibrosis, tubular injury, as well as inflammatory markers were increased in the congestive left kidney compared to the normal right kidney. In addition, the expression levels of these mRNAs were significantly reduced in the left kidney of GLO1-tg rats as compared with the left kidney of wild-type rats. [CONCLUSION] Carbonyl stress may exacerbate renal damage caused by renal congestion.

renal congestion, renal injury, carbonyl stress

講演番号：4E01-09
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:00～ ミーティングルーム E

スダチ果皮エキスの皮膚角化細胞における抗酸化遺伝子への影響

Effect of Citrus sudachi peel extract on antioxidant genes in epidermal keratinocytes

○植野 実佐子[1]、安部 庄剛[2]、下田 毬絵[3]、金岡 大樹[3]、山﨑 博子[3]、湯浅 恵造[1,2]（[1]徳島大院創成科学、[2]徳島大院先端技術、[3]松山油脂（株））
○Misako UENO[1], Shogo ABE[2], Marie SHIMODA[3], Hiroki KANAOKA[3], Hiroko YAMASAKI[3], Keizo YUASA[1,2] ([1]Tokushima Univ. Grd. Sch., [2]Tokushima Univ., [3]Matsuyama Co.,Ltd.)

【目的】老化は酸化ストレスに起因しており, 近年, 抗酸化機構として酸化ストレス応答転写因子 Nrf2 が注目されている。徳島県特産品であるスダチの約半分は加工品として消費されるが，加工過程において生じる搾汁残渣（果皮）の廃棄処理が問題となっている。一方，スダチ果皮には抗酸化活性を有するフェノール化合物を多く含んでおり，有効利用が望まれている。そこで本研究では，スダチ果皮エキス（SPE）の表皮角化細胞における抗酸化遺伝子への影響を検証し，化粧品有用成分としての可能性を検討した。【方法・結果】まず，SPE のヒト表皮角化細胞株 HaCaT 細胞に対する毒性を評価し，終濃度 3%以下において毒性を示さないことを確認した。次に，活性酸素種（ROS）産生の要因である紫外線に対する効果を検討した。SPE は UVB（5 mJ/cm^2）照射によって上昇した ROS 量を有意に抑制した。続いて，Nrf2 の標的遺伝子の一つである酸化ストレス防御遺伝子 HO1 と GCLC の遺伝子発現を調べた結果，いずれの遺伝子も SPE によって有意に上昇した。Nrf2 は通常，細胞質に局在するが，核へ移行し，ARE（antioxidant response element）配列に結合し転写を促進する。SPE 処理した細胞では，Nrf2 の核移行が促進され，また，ARE ルシフェラーゼレポーター活性が有意に上昇することを明らかにした。以上の結果より，SPE は抗酸化能を有し，抗酸化遺伝子の発現を誘導させることが明らかとなり，化粧品有用成分としての可能性が考えられた。

The citrus peel waste of the juice extraction process contains many phenolic compounds with antioxidant activity, and, therefore, its effective use is required. In this study, we investigated the effects of *Citrus sudachi* peel extract (SPE) on the expression of antioxidant genes in epidermal keratinocytes to assess its potential as an active ingredient in cosmetics. First, the toxicity of SPE on human epidermal keratinocyte cell line, HaCaT, was determined, and no toxicity was observed at concentrations below 3%. Next, we examined the effects of SPE on ultraviolet (UV)-induced reactive oxygen species (ROS) production, and found that SPE significantly reduced the amount of ROS produced by 5 mJ/cm^2 UVB irradiation. Furthermore, the expression of the oxidative stress defense genes, HO1 and GCLC, which are the target genes of Nrf2, were significantly increased by SPE treatment. Nrf2 translocates to the nucleus, binds to ARE (antioxidant response element) sequences, and promotes the transcription of the target genes. We found that Nrf2 nuclear translocation and ARE luciferase reporter activity were enhanced in SPE-treated HaCaT cells. These results indicate that SPE has antioxidant properties and induces the expression of antioxidant genes, suggesting that SPE may be a useful ingredient in cosmetics.

keratinocytes, Citrus extract, Nrf2

発表責任者：湯浅恵造（kyuasa@tokushima-u.ac.jp）

講演番号：4E01-10
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:00～ ミーティングルーム E

Plant-derived peptides that affect the glycation of human serum albumin

○Yi Lyu[1], Tomoya Ozawa[1], Mimin Zhang[1], Peng Lu[1], Ken Okamoto[1], Hideaki Itoh[1], Michio Suzuki[1], Kousuke Hanada[2], Hikaru Nakasone[3], Satoshi Kondo[3], Madoka Yonekura[3], Koji Nagata[1]
([1]The University of Tokyo, [2]Kyusyu Institute of Technology, [3]Toyota Motor Corporation)

Protein glycation, also known as the Maillard reaction, is a multistep non-enzymatic reaction between carbonyl groups on reducing sugars and amino groups on proteins. The reaction involves a variety of initiators and intermediates, mainly glucose or glucose-derived dicarbonyls, and generates a heterogeneous class of adducts, namely advanced glycation end-products (AGEs). Glycated proteins are closely linked to age-related diseases such as diabetic vascular complications, arteriosclerosis, among others.

This study explored the antiglycation potential of plant-derived peptides to search for novel agents that inhibit protein glycation. An increasing amount of studies have focused on the bioactive roles of plant peptides in recent years. In general, plant peptides exhibit not only phytohormone-like functions in regulating growth and development but also defensive roles in the plant immunity against invading pathogens. However, there is relatively little information referring to the antiglycation properties of plant peptides. This present study screened over 500 plant-derived short peptides obtained from tomato and salicylic acid (SA) or jasmonic acid (JA)-treated *Arabidopsis thaliana*. SA and JA are plant hormones that function in regulating the plant defense mechanism.

Each plant peptide was incubated with glucose and human serum albumin (HSA) at 60ºC for 40 hours. This way of *in vitro* glycation of HSA generates an equivalent amount of AGEs to 60 days of incubation at 37ºC. Used as the model protein in this study, HSA is the most abundant protein in serum and plays essential physiological and pharmacological roles, including drug delivery, blood pH and osmotic pressure maintenance. The negative control samples were treated under the same conditions, except for the absence of a plant peptide. The positive control samples contained an existing antiglycation agent: aminoguanidine, metformin, or AG herb mix to replace a plant peptide. The degree of glycation was evaluated using mass spectrometry using Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF/MS).

Among the over 500 plant-derived peptides being screened, 10 of them exhibited strong inhibitory activities toward the HSA glycation. Antiglycation potentials of these selected peptides were stronger than those of the positive control samples. Further investigation into this topic will focus on the inhibition mechanisms of these plant peptides.

Glycation, Plant peptides, MALDI-TOF/MS

発表責任者：Lyu Yi（lvyi961029@outlook.com）

講演番号：4E01-11
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:00～ ミーティングルーム E

Myricetin の認知機能低下抑制作用とそのメカニズム

The neuroprotective effect of Myricetin and its mechanism.

○島田 優、佐藤 由佳、熊添 基文、藤村 由紀、立花 宏文 (九大院農院・生機科)
○Yu Shimada, Yuka Sato, Motofumi Kumazoe, Yoshinori Fujimura, Hirofumi Tachibana (Kyushu Univ.)

認知症は、これまで多くの治療法が試みられてきたが、根本的な治療法は未だ確立されておらず、発病を予防することに注目が集まっている。一方、これまでに我々は、緑茶品種「サンルージュ」が老化促進モデルマウスにおいて、長期記憶能力および学習記憶能力の低下を予防することを見出した。また、その作用を担う候補成分としてフラボノールの一種である Myricetin を同定している。そこで本研究では、Myricetin の認知機能低下抑制作用ならびにそのメカニズムを検討した。

老化促進モデルマウス（SAMP8）に Myricetin を摂食させ、摂食 16 週間後に新奇物体認識試験、摂食 19 週間後に Y 字迷路試験を行った。その結果、新奇物体認識試験および Y 字迷路試験において、Myricetin の摂食により認知機能の低下が抑制された。Myricetin の認知機能低下抑制作用メカニズムを明らかにするため、脳由来神経栄養因子（BDNF）に着目した。ヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y を用いた検討において、Myricetin を nM オーダーで添加することにより、濃度依存的に環状アデノシン一リン酸(cAMP)産生量ならびに BDNF 遺伝子発現量が増加するとともに、神経突起が伸長することを見出した。また、老化促進モデルマウスにおいても Myricetin 摂取により、BDNF の発現が上昇することが明らかになった。

以上の結果より、Myricetin は老化促進モデルマウスにおける認知機能の低下を抑制すること、その作用機序として、cAMP/BDNF 経路の活性化が関与している可能性が示された。

Cognitive impairment is one of the serious problems in the aged and several therapeutic agents are still being developed, however, efficient countermeasure is not established. We previously demonstrated that Sunrouge, the novel green tea cultivar has the neuroprotective effect. Because, myricetin is the characteristic flavonol in Sunrouge, we assessed the neuroprotective effect of myricetin in vitro and in vivo. Oral administration of myricetin ameliorated cognitive impairment in SAMP8 model mice compared with vehicle treated mice. Myricetin treatment also upregulated the cyclic adenosine monophosphate (cAMP) and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in neuroblastoma cell line SH-SY5Y cells. Consistent with in vitro results, myricetin intake also upregulated BDNF expression in brain. Taken together, myricetin has neuroprotective effect accompanied with cAMP/BDNF axis activation.

myricetin, cognitive impairment, BDNF

講演番号：4E01-12
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:00～ ミーティングルーム E

官能評価値をオトガイ舌骨筋の表面筋電位を用いて可視化する

Sensory evaluation values were visualized using surface electromyography of the geniohyoid muscle

○森 安珠[1]、上田 玲子[1]、朝倉 富子[1]、阿部 啓子[1,2]([1]東京大学大学院　農学生命科学研究科　応用生命化学専攻、[2]神奈川県立産業技術総合研究所)
○Anju MORI[1], Reiko UEDA[1], Tomiko ASAKURA[1], Keiko ABE[1,2] ([1]Tokyo Univ., [2]Kanagawa Institute of Industrial Science and Technology)

【目的】　我々は先行研究において、市販の嚥下食品を用い表面筋電図法による客観的な「飲み込みやすさ」の評価系を構築した。食品の場合、物性・味・匂い・嗜好性など様々な要素が存在するため、本研究では、五基本味と嗜好性に着目して、官能評価と嚥下時のオトガイ舌骨筋の応答との関係を明確にすることを目的とした。
【方法】　五基本味溶液について、各 5 段階の嗜好・忌避濃度を含む（苦味除外）濃度水準を設定し、強度、嗜好、飲みこみやすさについて 20 代女性 41 名が 9 件尺度の採点法による官能評価を実施し、味質別に評価値を代表する各クラスターの 17～20 人が表面筋電位測定を行った。官能評価値を目的変数、14 の表面筋電図測定パラメーターを説明変数として PLS 回帰分析を適用し、味質間および濃度別官能評価値と表面筋電図測定パラメーターとの関係を解析した。
【結果】　官能評価値と筋電位要素で表される生体応答との関係は、各味質における味質間及び味質内共に異なったパラメーターで構成され、それぞれ高精度の予測が可能であった。その関係性を、プリファレンスマップを用いて可視化したところ、嚥下時の筋電位の周波数分布は、味溶液が忌避に向かうにつれて低周波数側にシフトすることが示唆された。

【Purpose】 In the previous study, we developed predictive models of objective easiness of swallowing by surface electromyography(sEMG) using diets designed for dysphagia. Since food has various factors such as physical properties, tastes, smells, or preferences, we focused on the five basic tastes, and clarify the relationship between sensory evaluation and response of the geniohyoid muscle during swallowing.
【Method】For each of the five basic tastes, PLS regression analysis was applied with the sensory evaluation value as the objective variable and the 14 surface sEMG measurement parameters as the explanatory variables.
【Results and Discussion】 The relationship between sensory evaluation values and biological responses represented by sEMG components was composed of different parameters between and within each taste, and those were highly predictable. We visualized it using preference maps, suggesting that as the taste solution more repellent, the frequency shifts to the lower frequency region.

taste, swallowing, electromyography

発表責任者：朝倉富子（asakura@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：4E01-13
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:00～ ミーティングルーム E

食事誘導性肥満ラットにおける消化管部位別の GLP-1 分泌応答と組織解析

GLP-1 responses and intestinal tissue analysis in diet-induced obese rats

○佐野 杏莉、比良 徹 (北海道大学農)
○Anri Sano, Tohru Hira (Hokkaido Univ.)

GLP-1(Glucagon-like peptide-1)は食事摂取に応じて消化管上皮に散在する L 細胞より分泌される消化管ホルモンで、インスリン分泌促進による血糖降下作用が知られている。インスリン抵抗性が惹起され食後高血糖となりやすい肥満者では、栄養素刺激に対する GLP-1 分泌応答の増減について様々な報告がなされている。当研究室では食事誘導性肥満ラットにおいて、栄養素刺激に対する GLP-1 分泌応答の増大が観察されているが、その機構は不明である。ここではその機構解明を目的とし、小腸部位別での GLP-1 分泌応答や遺伝子発現、免疫蛍光染色による GLP-1 産生細胞数などを調べた。

Sprague Dawley 系雄性ラットを用い、普通食、または 30%(w/w)高脂肪食と 30%(w/v)スクロース水を 5 週間自由摂食させた。麻酔下にて十二指腸または回腸に直接液体食を投与し、門脈から経時的に採血を行う *in situ* 試験と共に、解剖時に十二指腸から結腸までを採取し、腸組織の解析に用いた。

液体食投与に対する肥満誘導食摂取ラットの GLP-1 分泌応答は、普通食摂取ラットに比べて回腸投与で投与後 15 分から大きかったことから、肥満における GLP-1 分泌応答の増大に回腸部の寄与が大きいことが考えられた。腸組織 GLP-1 含量、栄養素感知/輸送体遺伝子発現を解析したが、群間差は見られなかった。また GLP-1 産生細胞数や局在にも群間差は見られず、食事誘導性肥満モデルにおける GLP-1 分泌応答の増大には別の因子や回腸より上部の消化管の寄与も考えられた。

GLP-1 is a gastrointestinal hormone, mainly secreted from lower part of the small intestine. We previously demonstrated that postprandial GLP-1 responses were larger in diet-induced obesity (DIO) rats than normal rats. The purpose of the present study is to elucidate the underlying mechanism.

Male Sprague-Dawley rats were fed normal diet or a high fat diet with sucrose solution ad libitum. After 5 weeks, a liquid diet was directly administered into to the duodenum or ileum, and portal vein blood samples were collected.

The GLP-1 response to ileal administration was higher in DIO rats than normal rats. However, ileum GLP-1 contents, GLP-1 producing cell number, and gene expressions of nutrient-sensing receptors did not differ between normal and DIO rats. These results suggest involvements of other factors in the adaptive enhancement of GLP-1 response.

Glucagon-like peptide-1, diet-induced obesity, postprandial response

講演番号：4E01-14
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:00～ ミーティングルーム E

食用酵素によるカゼイン分解物からのオピオイドペプチドの単離と性質

Identification and characterization of opioid peptides from casein hydrolysates prepared with food grade proteolytic enzymes

○竹内 柚衣、福永 もえ、宮永 一彦、岩谷 駿、山本 直之（東工大）
○ Yui TAKEUCHI, Moe FUKUNAGA, Kazuhiko MIYANAGA, Shun IWATANI, Naoyuki YAMAMOTO (Tokyo Tech)

【目的】ストレスに起因する様々な健康不安が近年大きな社会的問題となっており、食品由来ペプチドによるストレス改善効果が期待されている。過去に、鎮痛作用などモルヒネ様活性を期待した様々なオピオイド受容体アゴニストが医薬品として実用化されている。一方、食品蛋白質の酵素分解物でもオピオイド受容体への作用が報告されているが、食品成分としての実用例はほとんどない。本研究では、機能性食品成分として実用利用が可能なオピオイドペプチドの開発を目的に、乳由来カゼインと小麦由来グルテンを様々な食用酵素により分解し、受容体作用性成分をスクリーニングした。
【方法と結果】（１）cAMP によるオピオイド活性評価系の確立
オピオイド受容体と GloSensor cAMP biosensor を共発現した HEK293 細胞を用い、cAMP 産生抑制を示すペプチドを、オピオイドペプチドとして評価した。cAMP 濃度に依存する Luciferin の発光強度を連続的に１時間測定し、その積算値を用いてサンプル未添加時に対する低下割合を求めた。
（２）食品タンパク質由来ペプチドのスクリーニング
乳由来カゼインと小麦由来グルテンを各種食用酵素で分解し、上記の評価系で評価した。その結果、いくつかの酵素分解物で活性が確認された。より活性の高かったカゼインの麹菌酵素分解物を、Sep-pak Cartridge（C-18）に吸着させ、アセトニトリルで段階的に溶出し、更に複数回の逆相 HPLC によって活性画分を単離した。現在、ペプチドの同定を TOF-Mass 解析などにより進めている。

Peptides derived from food proteins have potential to reduce stress that is currently become a major social problem. Although various peptides that act on opioid receptors have been reported, there are few peptide materials that have been used in food materials. In this study, milk-derived casein and wheat-derived gluten are hydrolyzed by various edible enzymes. Then, opioid peptide was screened by measuring of intracellular cAMP as luciferin signal originated from HEK293 cells expressing opioid receptor and GloSensor cAMP biosensor. As the results, some proteolytic hydrolysates with opioid activities were selected. Active peptides in these fractions were fractionated by a Sep-pak cartridge (C-18) and following reverse phased HPLC. Finally, some peptides with opioid activities were purified and investigated TOF-mass analysis. Some of characteristic features will be presented in my talk.

opioid peptide, casein hydrolysate, δ-opioid receptor

発表責任者：竹内 柚衣（takeuchi.y.an@m.titech.ac.jp）

講演番号：4E01-15
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:00～ ミーティングルーム E

ダイダイ精油とタッチケアへの応用

Daidai Oil and its application for touch care treatment

○桜井 和俊[1]、玉井 英子[1]、益田 葉子[1]、浦上 研一[1]、楠原 正俊[2]([1]静ガン、[2]NTT 東伊豆病院)
○Kazutoshi Sakurai[1], Eiko Tamai[1], Yoko Masuda[1], Kenichi Urakami[1], Masatoshi Kusuhara[2]
([1]Shizuoka Cancer Center, [2]NTT East Izu Hospital)

タッチケア施術により、被験者がリラックスする事が報告されているが、主観的な評価を行っている例が多く客観的な評価を行っている例は少ない。一方、香り（ラベンダー油、オレンジ油やベルガモット油）を嗅ぐことにより、鎮静効果、リフレッシュ効果、あるいは、睡眠改善効果が認められている。

演者らは、入院中の肺ガン患者に対して香りを嗅ぎながらのタッチケア施術を実施しその効果を客観的に評価する事を検討している。本講演では、ダイダイ（学名：*Citrus aurantium* L.）の香りを嗅ぎながらの施術を行い、心拍変数を用いてその有効性を検証した。その結果、心拍数は、施術開始から徐々に低下し施術終了後 30 分経過した後でも、香り無しの施術と比べて施術前の値よりも低い傾向にあった。一方、心拍の周期変動の中間周波数成分 Low Frequency(LF)及び高周波数成分 High Frequency(HF)値から、HF 値と LF/HF 値の変化を判定したところ、副交感神経系活動が優位に強化されていることが判明した。すなわち、本施術は、ガン患者にとってタッチケアで経験する心地よい感覚と睡眠を誘うリラックス効果が長く継続させる事が推察された。

The touch care treatment (TCT) while sniffing Daidai oil (bitter orange: *Citrus aurantium* L.), was performed for the lung cancer patients in our hospital, and its effectiveness was evaluated using heart rate variables.

As a result, the heart rate (HR) values of patients were decreased during the treatment 2-3 beats/min and then the average HR tended to be lower than them of before treatment as compared with TCT without aroma even 30 minutes after the treatment. On the other hand, the parasympathetic nervous system activity was judged to be strengthened from the changes of HF and LF / HF values measured from HR sensor.

The TCT with aroma was thought to provide sleep inducing soothing sensations and relaxing effects for the cancer patients.

daidai oil, touch care treatment, heart rate variables

発表責任者：桜井和俊（k.sakurai@scchr.jp）

講演番号:4E03-01
質疑応答日時、会場:3 月 21 日 10:00～ ミーティングルーム E

質量分析計を用いたレスベラトロール構造異性体の硫酸化代謝物解析

Analysis of sulfated metabolites of resveratrol structural isomers by LC/MS

○中野 悠[1]、黒木 勝久[1]、ミンチェン リウ[2]、水光 正仁[1]、榊原 陽一[1]([1]宮崎大農、[2]トレド大薬)
○Yu NAKANO[1], KATUHISA KUROGI[1], Liu Ming-Cheh[2], MASAHITO SUIKO[1], YOICHI SAKAKIBARA[1]
([1]Miyazaki Univ., [2]Toredo Univ.)

【目的】硫酸化はホルモンや食品成分などの低分子生理活性物質の機能制御を担う重要な代謝反応である。しかし、低分子化合物の解析手法として主流である LC/MS において食品成分の硫酸化代謝物は殆ど対象にならない。近年、食品成分であるポリフェノール類は機能性食品成分として注目されており、その硫酸化代謝物にも機能性があることが明らかとされつつある。さらに、硫酸基が抱合される位置によっても機能性が変わることが知られている。Resveratrol は cis/trans の構造異性体があり、それぞれに特有の機能が知られている。そこで本研究では、resveratrol に着目し、それらの部位特異的な硫酸代謝物を LC-MS にて解析する為の条件検討と培養細胞を用いた代謝物解析を行なった。
【方法】サンプル前処理法について、固相抽出法を選択することにより、抱合状態で分離を行うための条件を検討した。次に、標品の抱合体の解析条件の検討を Orbitrap 型質量分析計(Q-Exactive)を用いて行なった。最後に、resveratrol の構造異性体を処理した HepG2(ヒト肝癌由来)細胞に対して異性体ごとに成分添加し、LC-MS で解析することで、resveratrol の代謝経路の解析を行なった。
【結果】サンプル前処理製品には高親水性逆相湿潤性ポリマー担体の「oais PRiME HLB」を使用した。次に、異性体ごとの検出限界と定量限界を LC-MS を用いて決定した。HepG2 細胞における代謝物解析では、異性体及び部位特異的な硫酸化代謝物を解析することに成功した。
【purpose】Sulfation plays a role in regulating the low-molecular-weight bioactive compounds. However, the sulfated metabolites of food components have not been well analysis by LC-MS due to the difficulty in the preparation of standard metabolites. Site-specific conjugates of polyphenols have been now shown to exhibit the differential activity. Therefore, direct quantitation of conjugated metabolites will lead to the elucidation of the activity of site-specific conjugates. In this study, resveratrol was used as a model food component and the cellular metabolism of resveratrol was analyzed by LC-MS.
【Methods】Experiment procedures and detection conditions were optimized for negative ion detection mode. HepG2 culture media treated with cis and/or trans resveratrol were collected, pretreated by SPE, and analyzed by LC/MS.
【Results】"Oais PRiME HLB" was the best SPE cartridge among tested. The limits of detection and quantification for each isomer were successfully determined. Site-specific sulfated metabolites of resveratrol isomers in HepG2 were analyzed.

Resveratrol, LC-MS, sulfation

発表責任者:中野悠(gc16026@student.miyazaki-u.ac.jp)

講演番号：4E03-02
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:00～ ミーティングルーム E

アピゲニンアグリコンおよび配糖体の腸管吸収における輸送経路の解明

Elucidation of intestinal absorption pathways of apigenin aglycones and glycosides in rats

○川本 実佳、室田 佳恵子（島根大生物資源）
○Mika KAWAMOTO, Kaeko MUROTA (Shimane Univ.)

【目的】フラボノイドは野菜や果物に豊富に含まれており、抗酸化作用や抗炎症作用といった様々な機能性をもつ。植物中では主に配糖体として存在している。我々は胸管リンパカニュレーションラットを用いて、フラボノイドが小腸で吸収された後、主に門脈を介して肝臓へ運ばれることに加え、一部がリンパ系を介して輸送されることを見出した。またケルセチンのアグリコンと配糖体を投与すると、どちらもリンパ液と末梢血の両方から検出された。本研究ではフラボンであるアピゲニン（Api）と Api-7-*O*-グルコシド(A7G)を投与した際の腸管吸収代謝と輸送経路について明らかにすることを目的とした。【方法・結果】胸管リンパカニュレーションラットに Api と A7G を投与し、リンパ液及び末梢血をそれぞれ採取した。それぞれに対して脱抱合処理を行った試料を HPLC 分析に供し、総アピゲニン濃度を算出した。その結果 Api と A7G では A7G の方が吸収性が高かった。さらにアピゲニンもケルセチンと同様に門脈に加えて、リンパ系へも輸送されることが明らかとなった。Api と A7G 投与後どちらも血漿濃度はリンパ液濃度より高く、アピゲニン代謝物の Tmax は Api と A7G 投与後どちらもリンパ液が血漿よりも遅れて観察された。これらの結果から、小腸で吸収されたアピゲニン代謝物はリンパよりも門脈へ輸送されやすいことが示唆された。またケルセチン投与時との比較より、フラボノイドは分子種によりリンパ輸送の程度が異なることが示された。

Flavonoids are mainly present as glycosides in plant foods. We found that flavonoids are absorbed via the portal vein and through the lymphatic system. In this study, the intestinal transport pathway after administration of apigenin (Api) and Api-7-O-glucoside (A7G) were investigated. Api and A7G were administered intraduodenally to thoracic lymph–cannulated rats. Collected lymph and peripheral blood were analyzed by HPLC. A7G metabolites were detected in the lymph and the plasma at higher levels than those of Api. Thus, apigenin was found to be transported to the lymphatic system as well as via the portal vein, similarly to quercetin absorption. The plasma levels were higher than the lymphatic levels after both Api and A7G administration, and the Tmax in the lymph was observed later than in the plasma. These results suggest that apigenin metabolites were absorbed in the small intestine preferentially via the portal vein, indicating that the contribution of the lymphatic transport of flavonoids may vary by the molecular species.

apigenin, intestinal absorption pathway, metabolite

発表責任者：室田佳恵子（murota@life.shimane-u.ac.jp）

講演番号：4E03-03
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:00～ ミーティングルーム E

糖質分解酵素阻害活性を有する東播磨地域産農作物のスクリーニング

Screening of Higashi Harima area agricultural crops for their glycohydrolase enzyme inhibitory activity

○栗山 磯子、山﨑 一諒、細川 敬三 (兵庫大・健康科学)
○Isoko KURIYAMA, Kazuaki YAMASAKI, Keizo HOSOKAWA (Hyogo Univ.)

【背景と目的】糖尿病は慢性的な高血糖状態により引き起こされる深刻な疾患の 1 つである。α-アミラーゼおよびα-グルコシダーゼなどの糖質分解酵素の阻害が、摂取した糖質の吸収を遅らせ、食後血糖値の急激な上昇を抑制して穏やかにすることで糖尿病の予防や改善に繋がる。そこで本研究では、東播磨地域産の農作物 11 種 21 部位についてα-アミラーゼおよびマルターゼ阻害活性に関するスクリーニングを実施した。

【方法】東播磨地域産の農作物 11 種類の各部位を凍結乾燥後、粉砕した。各凍結乾燥粉末を 3 種類の抽出溶媒(メタノール、50%メタノール、水)で抽出した。抽出液を減圧濃縮、凍結乾燥により調製した粗抽出物をα-アミラーゼおよびマルターゼ阻害活性試験に供した。α-アミラーゼ阻害活性は 4 U/mL ブタ膵臓由来α-アミラーゼおよび 1%可溶性でんぷん溶液を用い、酵素反応により生成した還元糖をジニトロサリチル酸法により測定した。マルターゼ阻害活性はラット小腸アセトンパウダーより粗酵素液を調製し、3.5 mM マルトースを用いて酵素反応により生成したグルコースを定量して算出した。

【結果と考察】α-アミラーゼ阻害活性を最も強く示したのは、まくわうり(皮)の 50%メタノール抽出物であった。またぺっちんうり(皮)の 50%メタノール抽出物など 5 種類のサンプルで阻害活性を示した。マルターゼ阻害活性は 7 種類のサンプルが 50%以上の阻害活性を示し、ぺっちんうり(果実)のメタノール抽出物が最も高い阻害活性を示した。ぺっちんうりはまくわうりの一種であり、別名メガメロンともいわれる東播磨地域の伝統野菜である。まくわうりと同様に、可食部(皮および果実)に中程度のα-アミラーゼ阻害活性および高いマルターゼ阻害活性がみられた。本研究により、東播磨地域産農作物の中に食後血糖値上昇抑制効果を持つものを見出すことができた。

Diabetes mellitus is a disease caused by chronic hyperglycemia. In this study, we investigated the α-amylase and maltase inhibitory activities in 63 sample solutions prepared from 11 agricultural crops grown in the Higashi Harima area. The results showed that the strongest α-amylase inhibition was observed in the 50% methanol extract of Oriental melon (peel). On the other hand, seven extract were found to have high maltase inhibitory activity. The highest inhibitory activity was observed in methanol extraction of Petchinuri (fruit). The present study suggested that the crops grown in the Higashi Harima area have the potential to moderate the rise in postprandial hyperglycemia.

agricultural crops, α-amylase, maltase

講演番号：4E03-04
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:00～ ミーティングルーム E

ヒマワリの脱脂種子の活用を目指した生体調節機能の探索

Biological Activities of Defatted Sunflower Seeds for Efficient Usage

○佐藤 咲希[1]、川添 華菜[1]、南 雄二[1,2]、加治屋 勝子[1,2]([1]鹿児島大学大学院農林水産学研究科、[2]鹿児島大学農学部食料生命科学科)
○Saki SATO[1], Haruna KAWASOE[1], Yuji MINAMI[1,2], Katsuko KAJIYA[1,2] ([1]Graduate School of Agriculture, Forestry and Fisheries, Kagoshima University, [2]Department of Food Science and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Kagoshima University)

鹿児島県の一部地域では、家庭から出る生ごみを発酵させて約 4～5 ヶ月かけて完熟堆肥を作り、これを利用して栽培したヒマワリを観賞資源として活用した後に、収穫したヒマワリ種子を乾燥・脱粒して油を搾り、食用油や化粧品材料として環境循環させている。ヒマワリオイルを精製する過程では大量の搾油粕が副産物として生産され、廃棄にかかるコストや保管場所が問題となっている。そこで、脱脂種子の食品としての利用を期待し、本研究では、搾油後に残る脱脂種子の特性解析ならびに生体調節機能の探索をおこなった。

ヒマワリの脱脂種子の基本的性質を把握するために、タンパク質含量の指標となる窒素含量を燃焼法にて、アミノ酸含量を高速液体クロマトグラフィー(HPLC)ならびにアミノ酸自動分析法にて測定した。その結果、ヒマワリの種子の約 30%がタンパク質で構成されており、アミノ酸としてはグルタミン酸やアスパラギン酸などが特に多く含まれていることが明らかになった。さらに、降圧作用が期待できる GABA の含量も測定した。また、抗酸化活性試験を行ったところ、ナタネやゴマの脱脂種子と比較して抗酸化活性が高く、過去3年間の収穫時期による差は見られなかった。このことから、フォーリンチオカルト法による総ポリフェノール量を測定したところ、他の脱脂種子と比較してヒマワリに含まれるポリフェノール含量が高いことが明らかになった。さらに、アンジオテンシン変換酵素(ACE)阻害活性試験を行ったところ降圧作用が認められた。ACE は、昇圧物質であるアンジオテンシンⅡを産生し高血圧を誘発するため、ヒマワリの脱脂種子は血圧調節に関与している可能性が示唆された。活性成分の探索は、HPLC や固相抽出法を用いた分画・精製を行い、成分同定を行った。

本研究では、ヒマワリの脱脂種子の再資源化により、産業廃棄物の低減につながるだけではなく、機能性素材としての新しい分野での産業創生にも期待できる可能性があることを見出せた。

Sunflowers are grown to make effective use of resources, harvesting, and sunflower seeds are pressed to obtain oil, which is used as an ingredient in food and cosmetics. However, there are growing concerns regarding cost for disposal of a large amount of defatted seeds and space for seed storage. Therefore, this study explored the biological activities of defatted sunflower seeds, with the aim of finding its effective use. Defatted sunflower seeds contained approximately 30% protein, particularly amino acids such as glutamic acid and asparagine. Defatted sunflower seeds had higher antioxidant activity and total polyphenol levels than those of defatted canola and sesame seeds. Moreover, ACE inhibition assay revealed that defatted sunflower seeds have antihypertensive activity, and the active ingredients were identified subsequently. The results of this study may contribute to not only reducing industrial waste but also generating active ingredients.

sunflower seed, angiotensin converting enzyme inhibiting activity, antioxidative activity

発表責任者：加治屋勝子（kajiya@chem.agri.kagoshima-u.ac.jp）

講演番号：4E03-05
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:00～ ミーティングルーム E

資源循環の取り組みから生まれたオイルの血管への作用
Effect of oils produced by resource recycling on blood vessels
○川添 華菜[1]、佐藤 咲希[1]、南 雄二[1,2]、加治屋 勝子[1,2]([1]鹿児島大学大学院農林水産学研究科、[2]鹿児島大学農学部食料生命科学科)
○ Haruna KAWASOE[1], Saki SATO[1], Yuji MINAMI[1,2], Katsuko KAJIYA[1,2] ([1]Kagoshima University・Graduate School of Agriculture, Forestry and Fisheries, [2]Kagoshima University・Faculty of Agriculture)

鹿児島県の一部地域では資源循環の取り組みとして、生ゴミを利用した完熟堆肥を生成し、それを用いて観光資源となるヒマワリ及びナタネの栽培をおこなっている。花期が終わり、種が実ると植物は収穫され、採種された後、搾油・精製して食用として利用することで、循環型社会の形成に寄与してきた。我々は、更なる用途拡大を目指し、これらの植物油を皮膚に塗布することで、どのような生体調節作用を示すか調べることを目的とした。

皮膚を透過する成分を得るため、表皮細胞を培養して表皮シートを作り、透過性試験を実施した。透過前後における脂肪酸等を測定し、組成の変化を調べた。また、経皮吸収による血管機能を確認するため、血管内皮細胞と植物油を継続的に共培養し、細胞の老化マーカーである senescence associated ß- galactosidase 活性を測定することにより、血管老化に対する影響を調べた。その結果、ナタネ油に高い老化抑制作用が見られたため、質量分析計付きガスクロマトグラフィーを用いて活性成分の探索を試みた。更に、細胞同士を結合して毛細血管の強化に関与している受容体型チロシンキナーゼ Tie2 活性化への影響についても確認をおこなった。活性化したリン酸化 Tie2 の定量にはサンドイッチ ELISA 法を用い、非活性の Tie2 との比を算出することで評価した。

In some areas of Kagoshima Prefecture, Japan, garbage is converted into compost to make effective use of resources. Further, this compost is used for cultivation of sunflowers and rape blossoms. After the flowers have been used for tourism, their seeds are harvested and processed for oil extraction. The aim of the present study was to determine the functionality of these oils. We cultured keratinocytes and prepared epidermal sheets for skin permeation tests. Further, the epidermal sheets were treated with sunflowers and rapeseed oils, whereby the components that permeated through the sheets were analyzed. Furthermore, the effect of oils on vascular function was observed and level of senescence-associated ß-galactosidase was measured. We observed that aging of cells was suppressed when cultured with rapeseed oil. Therefore, we attempted to identify the underlying active ingredient using GC/MS. Moreover, the effect on Tie2 activity was measured using sandwich ELISA. Tie2 is a receptor tyrosine kinase that contributes to the strengthening of capillaries by forming vascular endothelial cell-cell interactions.

blood vessels, aging, fatty acid

発表責任者：加治屋勝子（kajiya@chem.agri.kagoshima-u.ac.jp）

講演番号：4E03-06
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:00～ ミーティングルーム E

α-トコトリエノールのステロドホルモン分泌促進活性における標的タンパク質の解析

Analysis of target proteins in the steroid hormone secretagogue activity of α-tocotrienols

○長世 智朗、寺田 直史、加藤 英介（北大院農）
○Tomoaki NAGASE, Naohumi TERADA, Eisuke KATO (Hokkaido Univ.)

テストステロンは、多くの生理機能を有するホルモンである。体内テストステロン量の減少は、様々な症状を呈し、加齢性性腺機能低下（LOH）症候群と呼ばれている。男性の場合、テストステロンは主に精巣ライディッヒ細胞から分泌されるため、その分泌を促進することで LOH 症候群の治療や予防が可能と考えられる。我々は昨年度の本大会において、米ぬかに含まれるビタミン E の一種α-トコトリエノール（α-T3）が、ライディッヒ細胞モデルである I-10 細胞に作用してテストステロン分泌を促進させることを報告した。またその作用機構についても解析したが、標的タンパク質については不明であった。そこで、本研究ではα-T3 のターゲットとなる受容体の探索を行った。

α-T3 は、cAMP/PKA 経路依存的にステロイドホルモン分泌を増加させることから、GPCR が標的であることが想定された。そこで、ステロイドホルモン生合成に関与していることが報告されている各種 GPCR に着目してアンタゴニストと共投与を行った。これらのうちα-アドレナリン受容体、β-アドレナリン受容体、セロトニン 1A 受容体、セロトニン 2 受容体、CRF 受容体については、アンタゴニスト投与によるα-T3 の活性の抑制は見られなかった。一方、G protein-coupled estrogen receptor（GPER）については、その関与が示唆されたことから現在さらに解析を進めている。

Testosterone have variety of physiological functions. Reduction of testosterone level in a body causes various disorders, which is termed late-onset hypogonadism (LOH). In case of men, majority of testosterone is secreted from Leydig cells in testis, thus, promoting testosterone secretion from Leydig cells may be an effective treatment to treat and prevent LOH. Last year, we reported that α-tocotrienol (α-T3) promotes testosterone secretion in I-10 cells, a model of Leydig cells. However, the target protein of α-T3 was unclear. In this study, we investigated for the target receptor of α-T3.

It was assumed that GPCR is the target receptor of α-T3 because α-T3 increases testosterone secretion depending on cAMP/PKA pathways. Thus, we tried co-treatment with antagonist of GPCRs related to steroid hormone biosynthesis. Although most of the antagonists did not reduce the activity of α-T3, the association of G protein-coupled estrogen receptor (GPER) was suggested from the experiment. A further analysis of an involvement of GPER in the activity of α-T3 is currently on the way.

α-tocotrienol, steroid hormone, late-onset hypogonadism

発表責任者：Eisuke KATO（eikato@chem.agr.hokudai.ac.jp）

講演番号：4E03-07
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:00～ ミーティングルーム E

脳腸相関を活性化するホップ苦味酸摂取による注意機能およびストレス状態の改善

Hop-derived bitter acids improve attention and reduce stress through vagus nerve activation

○福田 隆文[1]、大沼 徹[2]、近藤 澄夫[3]、新井 平伊[2]、阿野 泰久[1] ([1]キリン中央研、[2]順大医、[3]福島健康管理センター)
○Takafumi FUKUDA[1], Tohru OHNUMA[2], Sumio KONDO[3], Heii ARAI[2], Yasuhisa ANO[1] ([1]Kirin Holdings Co. Ltd., Kirin Central Res. Inst., [2]Juntendo Univ., [3]Fukushima Healthcare Center)

超高齢社会となった日本国内において認知機能低下や認知症は大きな社会課題となっている。疫学調査によると適量の酒類の摂取は認知症の防御因子になるという報告がある。ビールの原料で、欧州では薬用植物として知られるホップ由来のビール苦味成分であるイソ α 酸のアルツハイマー病予防効果をこれまで報告した。さらに、熟成ホップ由来苦味酸(MHBA)が消化管の苦味受容体に作用し、迷走神経を通じた脳腸相関活性化により、認知機能および抑うつ状態を改善、アルツハイマー病を予防することが非臨床試験にて示されている[1)]。しかし、MHBA のヒトの認知機能および気分状態への作用は検証がなされていなかった。そこで本研究では、主観的認知機能低下(SCD, Subjective Cognitive Decline)の症状を有する被験者を対象としたランダム化二重盲検比較試験を行った。SCD 症状を有する 45–69 歳の健常中高齢男女 100 名を 50 名ずつ MHBA 含有カプセルもしくはプラセボに割り付け、12 週間摂取させた。摂取 0 週および 12 週目に神経心理テストを用いて認知機能の評価、唾液ストレス指標および質問紙を用いて気分状態の評価を行った。また、探索的に血中の認知症指標を測定した[2)]。その結果、摂取 12 週目において分配性注意機能を評価する符号数字モダリティ検査のスコアが MHBA 群では、プラセボ群と比較して統計学的に有意な高値を示した。また、唾液中ストレス指標である β エンドルフィン濃度が MHBA 群で、プラセボ群と比較して有意な低値を示した。さらに、アミロイド β と結合してシナプス毒性の抑制などに関与するトランスサイレチンの血中濃度が摂取 12 週目の MHBA 群で、プラセボ群と比較して有意な高値を示した。求心性迷走神経は青斑核ノルエピネフリン神経の活性化を通じて注意機能やストレス応答を制御することが報告されており、MHBA も本機序を通じて SCD 症状を有する健常人の注意機能およびストレス状態を改善したと考察される。ホップ由来苦味酸の継続摂取は、脳腸相関の活性化を通じて、加齢に伴い低下する認知機能を改善することが期待される。[1)] Ano Y., *Sci. Rep.*, 2020, [2)] Fukuda T., *J. Alzheimers Dis.*, 2020

Matured hop bitter acid (MHBA) improves cognitive function via vagal nerve activation in preclinical study, whereas the effect on human has not been investigated. A hundred subjects with subjective cognitive decline were received placebo or MHBA for 12 weeks in a randomized double-blinded placebo-controlled trial. At week 12, Symbol Digit Modalities Test assessing divided attention and serum transthyretin level were significantly higher and saliva β-endorphin level was significantly lower in the MHBA group.

brain-gut interaction, cognitive function, hop bitter acids

発表責任者：福田隆文（Takafumi_Fukuda@kirin.co.jp）

講演番号：4E03-08
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:00～ ミーティングルーム E

高い応答性を有する hT1R1/hT1R3 安定発現細胞株作出の試み

Construction of stable cell lines expressing hT1R1/hT1R3 with a distinct responsiveness toward umami substances.

○木寺 優太、竹谷 千晶、三坂 巧（東大院農生科・応生化）
○Yuta KIDERA, Chiaki TAKETANI, Takumi MISAKA (Dept.Appl.Biol.Chem.,The Univ.Tokyo)

【背景・目的】甘味受容体と旨味受容体は、クラス C GPCR ファミリーに属する T1Rs のヘテロダイマー（それぞれ T1R2/T1R3、T1R1/T1R3）から構成される。当研究室では、T1R2、T1R3、およびキメラ G タンパク質をタンデムに組み込んだ発現プラスミドを安定発現させた、応答性の高いヒト甘味受容体安定発現細胞株の作出に成功している。（Imada, T., *et al.*, ***BBRC***, 2010）

その一方で、発現コンストラクト中の T1R2 を T1R1 に変更したヒト旨味受容体安定発現細胞株は旨味物質に対する応答が全く得られていなかった。そこで本研究では新たなコンセプトのもと、受容体安定発現細胞株を複数種類作出し、旨味物質に応答しうる細胞株が得られるか検討した。

【方法・結果】今回は安定発現細胞の母体細胞を変更するとともに、受容体のみを安定発現する細胞株を作出することにした。二つの発現カセットをタンデムに並べるという基本的なデザインは維持したまま、hT1R1 と hT1R3 の順序やプロモーターの種類を変更した発現コンストラクトを計 8 種類作製した。CRISPR/Cas9 システムによってゲノム中の一か所に FRT 配列を組み込んだ HEK293T 細胞に、構築した発現コンストラクトを配列特異的組換えによって導入し、それぞれの安定発現細胞株を作出した。8 種類の受容体安定発現細胞株にキメラ G タンパク質とアポ発光タンパク質を遺伝子導入し、リガンド添加時の発光強度変化の検出を行った。その結果、旨味物質に対して応答を示す hT1R1/hT1R3 安定発現細胞株を得ることに成功した。最も応答性が高かった細胞株からは、一過性発現細胞とほぼ同等の応答強度が得られることが確認できた。

Umami taste perception in mammals is mediated by a heterodimeric G protein-coupled receptor, T1R1/T1R3. To generate a stable cell line expressing hT1R1/hT1R3 with a high responsiveness to umami substances, we here designed eight types of expression constructs that could be expressing both hT1R1 and hT1R3. Cell lines stably expressing the umami taste receptor (hT1R1/hT1R3) were obtained by introducing the expression construct into FRT-HEK293T cells using FRT site-specific recombination system. When a chimeric G protein was transiently transfected, some of the constructed cell lines successfully responded to umami tastant, L-Glu. The responsiveness of one of the stable cell line was comparable to that of HEK293T cells transiently expressing hT1R1 and hT1R3 together with a chimeric G protein.

taste receptor, stable cell line, umami substance

発表責任者：三坂巧（amisaka@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：4E03-09
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:00～ ミーティングルーム E

メチオノール構造類縁体の嗜好味受容体活性調節能の検討

Positive/negative allosteric modulation of structural analogs of methional to umami and sweet taste receptors

○五十嵐 晶帆、鈴木 あゆ、三坂 巧（東京院農生科・応生化）
○Akiho IGARASHI, Ayu Suzuki, Takumi Misaka (The Univ. Tokyo)

【背景】旨味・甘味といった嗜好味を呈する物質はクラス C GPCR ファミリーに属する T1Rs によって受容され、T1R1/T1R3・T1R2/T1R3 がそれぞれの受容体であることが明らかになっている。食品中にはイノシン酸のように、嗜好味受容体に呈味物質とともに作用することで、呈味強度の調節を行うような物質の存在が複数知られている。これまでに当研究グループでは、天然香気成分であるメチオナールが T1R1 サブユニットの膜貫通領域に作用することで、ヒト旨味受容体の活性を増強する作用を示すことを見出している（Toda *et al.*, ***Sci. Rep.***, 2018）。そこで本研究ではメチオナールの構造類縁体を対象に、嗜好味受容体の活性調節能を有する物質の探索を行った。
【方法】メチオナール構造類縁体として、化学構造が類似した水溶性の高い低分子化合物を検索し、市販で入手可能な 10 種類の化合物を評価に用いた。培養細胞にヒト甘味受容体あるいはヒト旨味受容体をキメラ G タンパク質とともに一過的・安定的に発現させた。受容体発現細胞にリガンドを投与した時の受容体活性化は、細胞内カルシウムイオン感受性蛍光指示薬の蛍光強度変化、あるいはカルシウム感受性発光タンパク質の発光強度変化によって評価した。
【結果と考察】スクラロースやグルタミン酸といった甘味・旨味を示す呈味物質にメチオナール構造類縁体を低濃度で混合し、甘味・旨味受容体の活性調節能をそれぞれ評価した。その結果、今回試行した化合物の中から、3 種類の化合物が甘味受容体特異的に活性増強能を有することが判明した。一方、これらの化合物は旨味受容体の活性には全く影響を与えなかったことから、甘味受容体特異的なサブユニットである T1R2 がそれらの作用部位であることが強く示唆された。

Umami and sweet tastants are recognized by members of class C GPCRs, such as T1R1/T1R3 and T1R2/T1R3, respectively. We have already found that a natural flavor compound methional could act as a positive allosteric modulator of human umami taste receptor (Toda *et al.*, ***Sci. Rep.***, 2018). In this study, we evaluated the modulating activities of structural analogs of methional against human umami and sweet taste receptor using a cell-based assay system. We here found that three compounds specifically enhanced human sweet taste receptor when they applied the receptor-expressing cells together with sweet tastants such as scrarolse. Since these compounds did not show the modulating activity against human umami taste receptor, it was strongly suggested that they would interact with T1R2 subunit.

taste, receptor, taste modulating substance

発表責任者：三坂巧（amisaka@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：4E03-10
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:00～ ミーティングルーム E

霊長類旨味受容体の機能と食性の関わりの解明
The relationship between the function of the umami taste receptor and diets in primates
○戸田 安香[1]、早川 卓志[2]、栗原 洋介[3]、中北 智哉[4]、河村 正二[5]、今井 啓雄[6]、石丸 喜朗[1]、三坂 巧[7] ([1]明大農・農芸化、[2]北大院地球環境・環境生物、[3]静大・農、[4]愛大・PROS、[5]東大院新領域・先端生命、[6]京大霊長類研・ゲノム細胞、[7]東大院農生科・応生化)
○Yasuka TODA[1], Takashi HAYAKAWA[2], Yosuke KURIHARA[3], Tomoya NAKAGITA[4], Shoji KAWAMURA[5], Hiroo IMAI[6], Yoshiro ISHIMARU[1], Takumi MISAKA[7] ([1]Dept. Agric. Chem., Meiji Univ., [2]Fac. Env. Earth Sci., Hokkaido Univ., [3]Ctr. Educ. Res. Field Sci., Fac. Agric., Shizuoka Univ., [4]PROS, Ehime Univ., [5]Dept. Integrated Biosci., The Univ. Tokyo, [6]Dept. Cellular Mol. Biol., Kyoto Univ., [7]Dept. Appl. Biol. Chem., The Univ. Tokyo)

嗜好味である旨味と甘味は、G タンパク質共役型受容体である T1R1 と T1R3 または T1R2 と T1R3 のヘテロダイマーでそれぞれ受容される。近年、これら T1R 受容体と動物の食性の間に深い結びつきがあることが明らかになってきた。例えば、肉食から竹食に転向したパンダは旨味受容体を構成する T1R1 を失っており、肉の旨味を感じることができない。また、肉食動物であるネコは甘味受容体を構成する T1R2 を失っており、糖の甘味を感じることができない。さらに、鳥類も T1R2 を失っているが、発表者らは、花蜜を主食とするハチドリでは旨味受容体が糖受容体としての機能を獲得していることを明らかにした。しかし、我々ヒトを含む霊長類の食性と T1R 受容体の機能の関係は未解明である。

ヒトはグルタミン酸ナトリウムに強い旨味を感じる。これと一致して、ヒト T1R1/T1R3 はグルタミン酸によって強く活性化される。一方、マウスや魚類の T1R1/T1R3 はグルタミン酸ではほとんど活性化されない。これまで、発表者らは霊長類の進化の過程で T1R1/T1R3 が高 Glu 活性を獲得したという仮説を立て、霊長類の食性と T1R1/T1R3 の機能の関わりを調べてきた。昨年度までに、17 種の霊長類の旨味受容体遺伝子をクローニングし、培養細胞を用いて機能解析を行うことで、グルタミン酸感受性の高い種と低い種を明らかにした。そこで今回は、各霊長類の食性や食物成分分析の結果から、T1R1/T1R3 のグルタミン酸感受性の有無と食物成分の関わりを検証した。

In vertebrates, palatable tastants are detected by a class C family of G protein-coupled receptors (GPCRs), T1Rs. The T1R family contains three receptors, T1R1, T1R2, and T1R3. The T1R1/T1R3 heterodimer mediates the umami taste, while T1R2/T1R3 mediates the sweet taste. Retention of these receptors over evolutionary timescale is dependent on feeding ecology. For example, the giant panda, an obligate bamboo-eater, has lost T1R1 and the cat, an obligate carnivore, has lost T1R2. Birds have also lost T1R2, although nectarivorous hummingbirds have subsequently acquired ability to detect sugars by changing the function of their T1R1/T1R3. However, the relationship between the Glu sensitivity of T1R1/T1R3 and primate diets remains unknown.

Here we test the evolutionary plasticity of T1R1/T1R3 as a sensor for protein sources of primate diets by analyzing the T1R1/T1R3 functions and the chemical compositions of diets.

taste, umami, GPCR

講演番号：4E03-11
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:00～ ミーティングルーム E

高温高圧水処理による低アレルゲン化食品素材の調製

Preparation of hypoallergenic food materials by high-temperature and high-pressure treatment

○尾近 和信[1]、長田 光正[2]、服部 誠[1]、好田 正[1] ([1]東農工大、[2]信大繊維)
○Kazunobu OKON[1], Mitsumasa OSADA[2], Makoto HATTORI[1], Tadashi YOSHIDA[1] ([1]Tokyo Univ. Agric. Tech., [2]Shinshu Univ.)

近年、食品アレルギー患者が増加する傾向をたどり、大きな社会問題となっている。しかし、食品アレルギーに対する根治的な治療法は未だ見つかっておらず、アレルゲンの除去が唯一の効果的な対策とされている。そのため、分解処理などによってアレルゲン性を低下させた低アレルゲン化食品素材の開発が求められている。現在、酵素処理による分解抗原の調製が行われているが、抗原ごとに適した酵素を選択する必要がある他、コストが高いという問題もある。一方で、高温高圧水処理を用いれば、様々な食品のアレルゲン性を簡便な方法かつ低コストで減少させることが可能である。分解抗原を食品素材として広く普及させることを考えると、アレルゲン性以外の食品科学的な機能性も重要になる。そのため、本研究では高温高圧水処理を用いて実用的な低アレルゲン化素材の調製法の確立を目指し、オボアルブミン(OVA)をモデルにして処理温度を変えて抗原性(アレルゲン性)への影響と、他の機能性への影響を調べた。分解抗原の抗原性は競合 ELISA 法によって、アレルゲン性は分解抗原を 20%含む飼料を OVA に特異的な食品アレルギーのマウスモデルである DO11.10 マウスに摂食させ、血清中の OVA 特異的 IgE 抗体濃度を測定することによって評価した。その結果、温度による有意な違いはなかったものの、高温高圧水処理によって分解した抗原では抗原性およびアレルゲン性の低下が確認された。現在、分解抗原の気泡性を検討中である。

Recently, food allergy patients tend to be increasing and food allergy is a big social problem. However, the definitive treatment of food allergy has not been established, so that patients need to avoid allergens. Therefore, it is necessary to develop hypoallergenic food materials. Currently, degraded antigens are prepared by enzyme treatment, but this way has problems with versatility and cost. On the other hand, high-temperature and high-pressure treatment would be a useful method to reduce the allergenicity of various foods. In order to apply the degraded antigens as food materials, functionality as well as allergenicity is also important. In this study, we aimed to establish a method for preparing a practically useful food hypoallergenic material using high-temperature and high-pressure treatment.

food allergy, high-temperature and high-pressure treatment, hypoallergenicity

講演番号：4E03-12
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:00～ ミーティングルーム E

花粉関連食物アレルギー症候群における gibberellin-regulated protein の交差要因の解析

Analysis of the structural factors of gibberellin-regulated protein on a cross-reactivity of pollen-related food allergy syndrome.

○蕭 喬丹[1]、CABANOS Cerrone[1]、福冨 友馬[2]、丸山 伸之[1]([1]京大農、[2]国立病院機構相模原病院)
○Kyotan SHO[1], Cerrone CABANOS[1], Yuma HUKUTOMI[2], Nobuyuki MARUYAMA[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Sagamihara National Hospital)

「花粉関連食物アレルギー症候群」は、花粉に対して感作された人が果物類などの食物を摂取したときにアレルゲンの交差反応によって症状を発症する疾患である。近年、スギなどのヒノキ科花粉についても原因となることが明らかになってきている。本研究では、スギ花粉 gibberellin-regulated protein(GRP)に感作されている果物アレルギー患者において、花粉と果物との交差反応に関与する GRP の構造要因を明らかにすることを目的とした。

モモとスギ花粉 GRP の共通するアミノ酸残基をグリシン残基に置換したスギ花粉 GRP 変異体を 4 種類構築した。これらの組換えタンパク質を *Pichia pastoris* を用いて発現させ、精製した。4 種類の変異体は、ゲル濾過クロマトグラフィーにおいて野生型 GRP(WT)とほぼ同一の溶出ピークを示し、サーマルシフトアッセイによる熱変性曲線も類似していた。WT に還元剤存在下で加熱処理を行うと、未変性時に見られた熱変性のピークがほぼ消失した。この条件で変性処理を行った WT では、ELISA での GRP と患者血清中の IgE 結合量が未変性の WT と比較して下がったことから WT のコンフォメーションがエピトープとして大きく寄与していることが示された。全ての変異体において IgE 結合量が WT より減少し、変異体間でその減少量にも違いがみられた。N 末端側のアミノ酸残基を置換した変異体では減少が大きかった為、その領域がエピトープとしての影響が大きい可能性が示唆された。

"Pollen-related food allergy syndrome" (PFAS) is a disease associated with allergic symptoms due to a cross-reactivity of homologous proteins between pollen and food. Recently, it has been suggested that a sensitization to Cupressaceae pollen is involved in PFAS. The purpose of this study is to clarify the structural factors of epitopes of cedar gibberellin-regulated protein (GRP), one of allergens related to PFAS. We designed four types of GRP mutants which are substituted to Gly about identical residues on a sequence alignment between peach and cedar GRPs. Gel filtration chromatography and thermal shift assay suggest that purified mutants show similar conformation to that of wild type of GRP (WT). Under a denatured condition, the IgE-binding of WT was reduced in ELISA assay, suggesting importance of conformational epitope. The IgE-binding of all four types of mutants were reduced compared to WT and the difference of a reduction between them was observed. The IgE-binding of the mutants substituted at N-terminal region was significantly reduced, suggesting that N-terminal region of GRP may influences antigenicity.

Pollen-related food allergy syndrome, epitope, allergen

講演番号：4E03-13
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:00～ ミーティングルーム E

低アレルゲン化ホエイタンパク質の経口投与による牛乳アレルギーの発症抑制

Suppression of cow's milk allergy by pre-administration of the hypoallergenic milk whey protein

○湯澤 美沙季、橋本 啓、東 徳洋、山田 潔 (宇都宮大農)
○MISAKI YUZAWA, KEI HASHIMOTO, NORIHIRO AZUMA, KIYOSHI YAMADA (Utsunomiya Univ.)

食物アレルギーの耐性獲得には、経口免疫寛容を誘導することが重要であると考えられている。β-ラクトグロブリン(β-LG)を含むホエイタンパク質（WP）を、高圧下ペプシン処理することにより、含まれているβ-LG のアレルゲン性を低下させるだけでなく、β-LG に対する経口免疫寛容を誘導できることを明らかにしてきた。本研究では、この低アレルゲン化 WP を、予め経口投与することにより、β-LG に対する食物アレルギー発症を抑制できるか検討した。低アレルゲン化 WP を 2 週間毎日経口投与したマウスに、経皮感作を 3 週間行った。WP を 50 mg 経口投与（Challenge）後、直腸温を測定した。感作後および Challenge 後に採血を行い、ELISA 法により血中の mMCP-1 濃度を測定した。WP の経口投与により誘導される直腸温低下を評価した結果、低アレルゲン化 WP 投与群では体温低下は認められなかった。一方で、コントロール群では有意な体温低下が認められた。ELISA 法により血中の mMCP-1 濃度を測定した結果、コントロール群では Challenge 後の mMCP-1 濃度上昇が認められたが、低アレルゲン化 WPI 投与群では認められなかった。これらのことから、低アレルゲン化 WP をアレルゲン感作前に投与することによって，食物アレルギーの発症を抑制できることが示唆された。また、発症抑制には、腸管粘膜におけるマスト細胞の脱顆粒の抑制が寄与していることが考えられた。

Inducing oral tolerance is important for tolerance acquisition of food allergy. Whey protein (WP), including β-lactoglobulin (β-LG), treated with pepsin under high pressure has been shown to be hypoallergenic and induce oral tolerance against β-LG. In this study, we investigated whether the onset of food allergies could be suppressed by oral administration of this hypoallergenic WP in advance. Mice to which hypoallergenic WP was orally administered daily for 2 weeks were subjected to epicutaneous sensitization with β-LG for 3 weeks. Rectal temperature was measured after challenge via oral administration of 50 mg of WP. Blood samples were collected after sensitization and challenge, and the serum mMCP-1 concentration was measured by ELISA. No decrease in rectal temperature was observed in the hypoallergenic WP group, coincident with no increase in the serum mMCP-1 concentration. These results suggest that pre-administration of hypoallergenic WP can suppress the mast cell degranulation in the intestinal mucosa and the onset of food allergy against β-LG.

food allergy, hypoallergen, oral tolerance

講演番号：4E03-14
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:00～ ミーティングルーム E

食品アレルギーの緩和作用を持つ食品因子の探索とそのメカニズム解析

Investigation of food factors alleviating food allergy and the mechanism analysis

○稲葉 亮平、服部 誠、好田 正（東農工大農）
○Ryohei INABA, Makoto HATTORI, Tadashi YOSHIDA (Tokyo Univ. Agric. Tech.)

食品アレルギーの薬剤療法は、抗ヒスタミン剤やステロイドを投与するため、副作用が懸念され、近年注目されているアレルゲン免疫療法は、アレルゲン投与による局所や全身のアレルギー反応が起こる危険性がある。加えて、期待されているほどの効果は得られていないことから、より効果的で薬を使わないリスクの低い安心な対策が望まれている。

本研究では、食酢原料の中でもビタミンやミネラルなどの多様な成分を豊富に含んだ黒酢に着目して、抗アレルギー効果とそのメカニズムを解析した。

卵白アルブミンを含む飼料を与えることで食品アレルギーを誘導させた DO11.10 マウスに、黒酢を強制経口投与し、その抗アレルギー効果を血清中の IgE 抗体産生量、アナフィラキシーショック試験によって調べた。その結果、黒酢を投与した群でアナフィラキシーショックと IgE 産生量が抑制された。黒酢中の活性成分を明らかにするために、酢酸を用いて同様の実験を行ったところ、アナフィラキシーショックは抑制されたものの、IgE 産生量は対照群と同様、もしくはそれ以上の値を示した。また *in vitro* でマスト細胞の脱顆粒抑制実験を行った結果、黒酢と酢酸ともに脱顆粒を抑制した。すなわち、黒酢中には脱顆粒を抑制してアレルギー症状を抑える物質と、IgE 産生を抑制してアレルギー体質を改善する物質の両方が含まれていることが明らかとなった。

In this study, we used black vinegar to identify its anti-allergic effects and the mechanism. Black vinegar is known to be rich in various substances such as vitamins and minerals, and have been reported to have health promoting effects.

We administered black vinegar by oral gavage to DO11.10 mice that had been fed with ovalbumin and examined its anti-allergic effects based on antibody production, and anaphylactic shock test. Anaphylactic shock and IgE production were suppressed in the black vinegar group. On the other hand, anaphylactic reaction but not IgE production was suppressed in the acetic acid group. Besides, we also observed that both black vinegar and acetic acid inhibited mast cell degranulation *in vitro.*

In brief, black vinegar has both substances the one suppresses degranulation and alleviates allergic symptoms, and the other suppresses IgE production and improves allergic constitution.

Food allergy, Anaphylactic reaction, IgE

講演番号：4E03-15
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:00～ ミーティングルーム E

実験的アレルギー性腸炎における肥満細胞の役割
The role of mast cells in the development of experimental allergic enteritis
○戸田 雅子[1]、Blanco Frank[2]、Gonzalez Menendez Irene[3]、Stassen Michael[4]、Quintanilla Martinez Leticia[3]、Feyerabend Thorsten[5]、Rodewald Hans Reimer[5]、Vieths Stefan[2]、Scheurer Stephan[2] ([1]東北大農、[2]Paul-Ehrlich-Institut、[3]Tubingen Univ.、[4]Mainz Univ.、[5]Heidelberg Univ.)
○ Masako Toda[1], Frank Blanco[2], Irene Gonzalez Menendez[3], Michael Stassen[4], Leticia Quintanilla Martinez[3], Thorsten Feyerabend[5], Hans Reimer Rodewald[5], Stefan Vieths[2], Stephan Scheurer[2] ([1]Tohoku Univ., [2]Paul-Ehrlich-Institut, [3]Tubingen Univ., [4]Mainz Univ., [5]Heidelberg Univ.)

アレルギー性腸炎（Allergic enteritis ： AE）は牛乳、大豆、鶏卵などの摂食によって起こる消化管アレルギーであるが、その発症機序は未だ不明な点が多い。本研究は AE 発症における肥満細胞の役割について、2 種類の異なる肥満細胞欠損マウス（KIT(W-sh/W-sh) と Cpa3cre/+）を用いて解析を行った。AE はマウスにオボアルブミン（OVA）感作と卵白食用投与を行うことにより誘導した。野生型マウスに比較して、KIT(W-sh/W-sh)マウスでは炎症部位における好酸球と好中球の浸潤が抑制され、炎症レベルの低下が観察された。一方、Cpa3cre/+マウスでは炎症部位における好酸球浸潤は抑制されたが好中球浸潤が認められ、炎症レベルは野生型とほぼ同程度であった。さらに KIT(W-sh/W-sh) マウスと Cpa3cre/+マウスの腸管においては、好酸球遊走に関与するケモカイン CCL1 の発現が減少していた。KIT(W-sh/W-sh)マウスにおける W 遺伝座の突然変異は肥満細胞を欠損させるが、他の造血系にも影響を与える。一方、Cpa3cre/+マウスでは欠損が肥満細胞に特化されている。以上より、肥満細胞は CCL1 を介して AE 部位への好酸球浸潤を誘導することが示唆された。また AE において好中球浸潤が認められた場合は、好酸球とともに好中球を標的とする必要性が示唆された。本研究で得られた知見は AE の治療ストラテジーの確立に貢献するものである。

Allergic enteritis (AE) is a gastrointestinal form of food allergies. The presence of mast cells and granulocytes has been detected in the inflamed tissues of AE. This study aimed to elucidate a role of mast cells in the development of AE using two types of mast cell deficient mice: KIT(W-sh/W-sh) mice bearing the W-sash (W(sh)) inversion mutation and Cpa3Cre/+ mice, which lack mast cells due to Cre-mediated mast cell eradication. KIT(W-sh/W-sh) mice reduced inflammatory levels of AE (e.g. villous atrophy, edema, and granulocyte accumulation), whereas Cpa3Cre/+ mice developed AE as seen in WT mice. Histological and FACS analysis showed that Cpa3Cre/+ mice reduce eosinophil accumulation but retain neutrophil accumulation in AE sites. The expression of CC chemokine ligand 1 (CCL1: I-309), a known eosinophil chemoattractant, were reduced in intestines of both mast cell deficient mice. The results suggest that (i) mast cells play a role in the accumulation of eosinophils in AE, and (ii) targeting both eosinophils and neutrophils are necessary in the treatment of AE, when neutrophil accumulation is observed at inflammatory sites in AE patients. This study offers implications to establish AE treatments that target infiltrating leucocytes in AE tissues.

Mast cells, Allergic inflammation, Food allergy

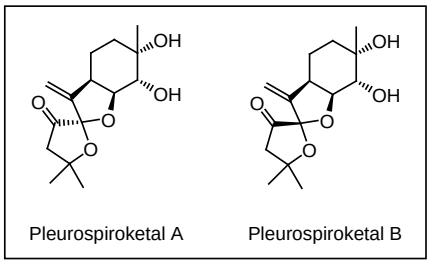
発表責任者：戸田雅子（masako.toda.a7@tohoku.ac.jp）

講演番号：4F02-01
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:30～ ミーティングルーム F

Pleurospiroketal 類の合成研究

Synthetic studies on Pleurospiroketals

○帯津 陽一、小倉 由資、渡邉 秀典、滝川 浩郷（東大院農）
○Youichi OBITSU, Yusuke OGURA, Hidenori WATANABE, Hirosato TAKIKAWA (Univ. of Tokyo)



Pleurospiroketal 類は食用キノコの *Pleurotus cornucopiae* より単離されたセスキテルペノイドであり、リポ多糖で活性化されたマクロファージの一酸化窒素(NO)産生阻害活性および HeLa 細胞に対する細胞毒性を有している。そのため、新規抗がん剤リード化合物としての働きが期待されているが、その作用機序はいまだ不明である。そこで、活性試験への試料供給を目的として本化合物群の合成研究に着手した。

我々は既に 2019 年度大会において Pleurospiroketal A のラセミ体合成を報告している。しかし、Pleurospiroketal A および B の前駆体をそれぞれ単一なジアステレオマーとして分離することができたにも関わらず、最終段階の脱保護においてスピロ中心の異性化が観測されており検討の余地が残されていた。そのため、本年度はその検討の結果を報告する。また、キラルプール法による天然型 Pleurospiroketal 類の合成にも成功したので、その詳細についても報告する。

Pleurospiroketals are isolated from edible mushroom *Pleurotus cornucopiae*. They have inhibitory activity against NO production and cytotoxicity against HeLa cell line. We have already reported racemic synthesis of Pleurospiroketal A. Although we obtained single diastereomer of both precursers for Pleurospiroketals A and B, we observed partial epimerization of spiro center in the last step. We would like to report synthesis of (+)-Pleurospiroketal A and B by using (-)-perillaldehyde as a chiral pool.

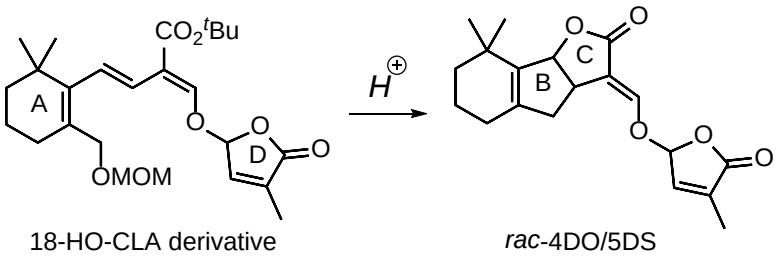
total synthesis, chiral pool, stille coupling

講演番号：4F02-02
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:30～ ミーティングルーム F

推定生合成経路に基づくストリゴラクトン類の合成研究

Synthetic study on strigolactones based on its hypothetical biosynthetic pathway.

○塩谷 七洋[1]、若林 孝俊[2]、茂田 巧[1]、小倉 由資[1]、杉本 幸裕[2]、滝川 浩郷[1]([1]東大院農、[2]神大院農)
○ Nanami SHIOTANI[1], Takatoshi WAKABAYASHI[2], Takumi SHIGETA[1], Yusuke OGURA[1], Yukihiro SUGIMOTO[2], Hirosato TAKIKAWA[1] ([1]The Univ. of Tokyo, [2]Kobe Univ.)



18-HO-CLA derivative　　*rac*-4DO/5DS

ストリゴラクトン (以下 SL) はストライガなどの根寄生雑草の発芽刺激物質として単離・同定された天然物の総称であり、植物の分岐抑制作用やアーバスキュラー菌根菌との共生シグナルとしての作用も報告されているテルペン類である。SL の生合成経路は広く研究されており、カーラクトン酸 (CLA) が重要中間体であるということが明らかになっている。CLA の 18 位炭素が P450 による酸化を受けることで 18-HO-CLA が生成し、それが連続的環化反応を進行することで、4-deoxyorobanchol (4DO) や 5-deoxystrigol (5DS) が生合成される。しかしながら、その反応で 18-HO-CLA を経由していることを示す研究成果は報告されているものの、環化反応の詳細は未だ不明である。我々は、この 4DO/5DS の生合成において、18-HO-CLA が生成後、即座に環形成が進行するため単離可能な安定中間体は存在しないのではないかと考えた。そこで、独自開発した合成法により 18-HO-CLA 誘導体を調製し、これを酸性条件で処理した。その結果、4DO/5DS のラセミ体が合成されることを見出し、SL の推定生合成経路の再現に成功した。本大会ではその研究の詳細について発表する。

Strigolactones (SL) are the natural products known as rhizosphere semiochemicals and phytohoromones. Canonical SL consists of a tricyclic lactone (ABC-rings) and a butenolide unit (D-ring). In the biosynthetic pathway of canonical SL, 4-deoxyorobanchol (4DO) and 5-deoxystrigol (5DS) are synthesized from carlactonoic acid (CLA) via BC-ring formation. Although SL's biosynthesis has been extensively studied, the mechanism of ring formation is unclarified.

Recently, we have established the original strategy for the synthesis of CLA esters in short steps. And based on this method, we are successful in synthesizing 18-HO-CLA derivative and its conversion into *rac*-4DO/5DS by acid-mediated cyclization. In this presentation, we would like to present the detail of the "biomimetic" synthesis of *rac*-4DO/5DS.

Strigolactone, Carlactonoate, Cascade cyclization

発表責任者：塩谷七洋（shiotani-nanami848@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

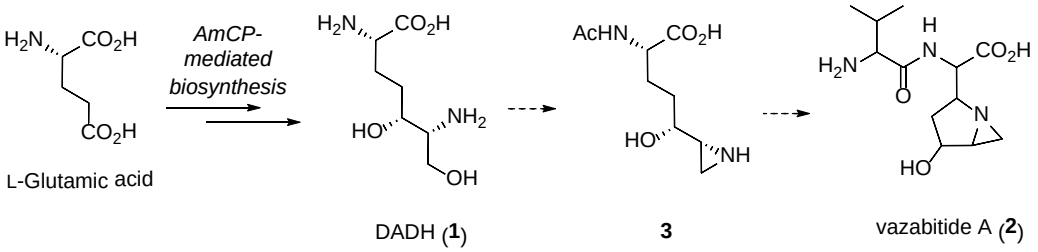
講演番号：4F02-03
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:30～ ミーティングルーム F

(2*S*,6*R*)-ジアミノ-(5*R*,7)-ジヒドロキシヘプタン酸(DADH)及びその誘導体の立体選択的合成

Stereoselective synthesis of (2*S*,6*R*)-diamino-(5*R*,7)-dihydroxy-heptanoic acid (DADH) and its derivatives

○岡村 仁則[1]、保野 陽子[1]、滝川 浩郷[2]、品田 哲郎[1] ([1]阪市大院理、[2]東大院農生科)
○Hironori OKAMURA[1], Yoko YASUNO[1], Hirosato TAKIKAWA[2], Tetsuro SHINADA[1] ([1]Osaka City University, [2]The University of Tokyo)

(2*S*,6*R*)-diamino-(5*R*,7)-dihydroxy-heptanoic acid (DADH) (**1**)は、放線菌 *Streptomyces* sp. SANK60404 株より単離された非タンパク質構成アミノ酸である[1)]。本化合物はアミノキャリアタンパク質(AmCP)を介した生合成経路にて合成されており、vazabitide A (**2**)の推定生合成中間体である。AmCP を介した DADH の生合成遺伝子群は放線菌類の多くに確認されており、放線菌類の重要な代謝経路のひとつであることが示唆されている。また、DADH 自身にも免疫抑制活性やイネ科植物の生育阻害活性などの生物活性が認められている。以上の背景から、DADH が関与する二次代謝経路、及び DADH の生物学的意義の解明を目的として本化合物の合成研究に着手した。



前年度大会において、我々は DADH から vazabitide A へと至る推定生合成中間体 **3** を標的とした合成研究について報告した[2)]。本大会ではその後の進展として、前年度大会にて確立した合成経路を基にした、DADH 及びその誘導体の立体選択的な合成について報告する。

(2*S*,6*R*)-diamino-(5*R*,7)-dihydroxy-heptanoic acid (DADH) (**1**) is a non-proteinogenic amino acid isolated from *Streptomyces* sp. SANK60404. This compound is biosynthesized via amino group carrier protein (AmCP)-mediated biosynthetic pathway and it is a putative biosynthetic intermediate of a unique peptide natural product vazabitide A (**2**). In addition, DADH also possesses biological activities including immunosuppressive activity and hypocotyl elongation inhibition. In the last JSBBA annual meeting we reported the synthetic study of a putative biosynthetic intermediate **3**. In this presentation, we would like to report the recent progress, including a synthesis of DADH derivatives.

1) F. Hasebe et al. *Nature Chemical Biology*, **2016**, *12*, 967-972
2) M. J. Burk et al. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 4345-4353

non-proteinogenic amino acid, stereoselective synthesis, biosynthetic intermediate

講演番号：4F02-04
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:30～ ミーティングルーム F

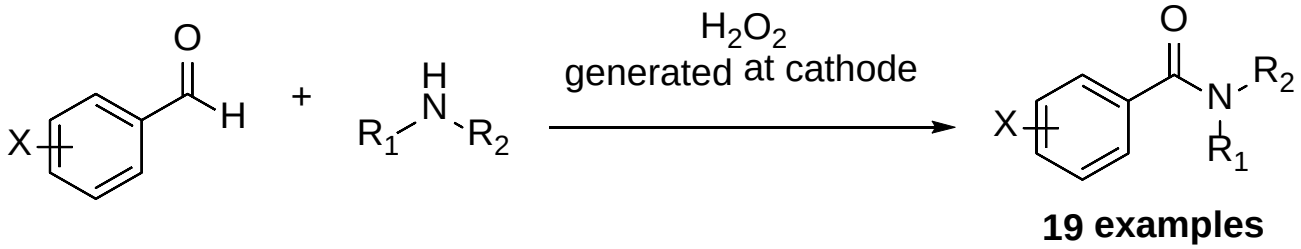
電気化学的手法を用いたベンズアルデヒドとアミンのアミド結合形成反応

Electrochemical Amide Bond Formation from Benzaldehydes and Amines: Oxidation by Cathodic-Generated Hydrogen Peroxide

○黒瀬 佑馬[1,2]、今田 泰史[1]、岡田 洋平[1,2]、千葉 一裕[1,2] ([1]東農工大院、[2]日本農芸化学会)
○Yuma KUROSE[1,2], Yasushi IMADA[1], Yohei OKADA[1,2], Kazuhiro CHIBA[1,2] ([1]Tokyo University of Agriculture and Technology, [2]Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry)

アミド結合は有機化学において最も重要な結合の 1 つとして数多くの結合形成反応が報告されている。現在広く用いられる方法としてカルボン酸とアミンの縮合反応が挙げられるが、多量の縮合剤を使用し廃棄物が多いという問題を抱えているため、代わる新しいアプローチとしてアルデヒドとアミンによる酸化的アミド結合形成が研究されるようになった。しかし高価あるいは有毒な金属試薬の使用、高温が必要などの改善点も残されていた。

これらの問題に対し、近年環境調和型の反応として注目される電気化学的手法を用いることでクリーンかつ効率的なアミド結合形成が可能になると考え、その反応開発を行うこととした。検討の結果、アセトニトリル/過塩素酸ナトリウム系において電気化学的手法により 19 種のベンズアミド誘導体を合成することに成功し、反応メカニズムの解析では中間体としてのヘミアミナールの形成、陰極による酸素の還元で発生する過酸化水素由来の酸化が反応に影響していることが示唆された。



Although amide bond formation from aldehydes and amines has been popular synthetic toolbox, most of the previous reported reactions depend on transition-metal catalysts or expensive oxidants(1).

We considered that more environmentally benign and safer approach could be achieved by electrochemistry. 19 benzamide derivatives are obtained on this reaction. NMR study, cyclic voltammetry (CV) investigation and control experiments show that the corresponding intermediate, hemiaminal, should be transformed into the amide: it is oxidized by hydrogen peroxide which is *in-situ* generated by cathodic reduction of molecular oxygen(2).

References

(1) R. Cadoni, A. Porcheddu, G. Giacomelli, L. D. Luca, *Org. Lett.* **2012**, *14*, 5014-5017
(2) D. Pletcher, *Acta Chem. Scand.* **1999**, *53*, 745-750

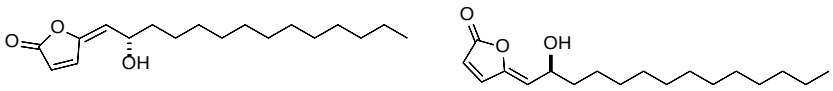
amide bond formation, electrolysis, hydrogen peroxide

講演番号：4F02-05
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:30～ ミーティングルーム F

Hygrophorone F および G の合成
Synthesis of Hygrophorone F and G

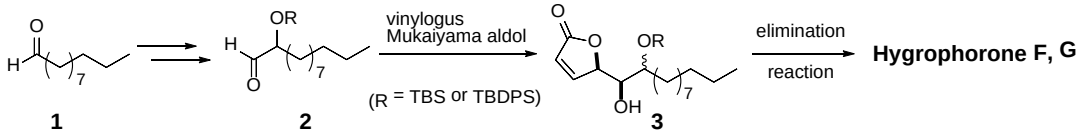
○田中 咲妃、森口 舞子、姜 法雄、久世 雅樹 (神戸大農)
○Saki TANAKA, Maiko MORIGUCHI, Bobwoong KANG, Masaki KUSE (Kobe Univ.)

【目的】Hygrophorone F および G はヌメリガサ属キノコ（*Hygrophorus latitabundus*）から単離された抗菌活性を示す天然物であり、アルキリデンブテノリドにおける *E/Z* 幾何異性が異なっている。本研究では、ブテノリド骨格を構築するビニロガス向山アルドール反応、およびそれに続くアルキリデン部分を構築する脱離反応の立体選択性を向上させることで、hygrophorone F および G を選択的に合成することを目的とした。



Hygrophorone F **Hygrophorone G**

【方法・結果】アルデヒド (**1**) を α-シロキシアルデヒド (**2**) へと変換し、シロキシフランとのビニロガス向山アルドール反応によりブテノリド (**3**) を合成した。このジアステレオ選択性は BF_3•OEt_2 を触媒とした場合に syn 体が優先することが分かった。次にヒドロキシ基をメシル化し、その脱離反応の *E/Z* 選択性について検討した。塩基として Et_3N を用いた場合、選択性は向上しなかったが、*t*-BuOK を用いると *E/Z* 選択性が向上した。また、**2** の保護基を TBS 基から TBDPS 基へと変更したところ、反応収率を向上させることができた。最後に TBDPS 基を脱保護することで、hygrophorone F および G の選択的な全合成に成功した。



1 **2** **3**

Antifungal hygrophorone F and G were isolated from *Hygrophorus latitabundus*, and they are *E/Z* geometric isomers at the alkylidenebutenolide moiety. The purpose of this study was to improve the stereoselectivity of the vinylogous Mukaiyama aldol reaction that constructs the butanolide skeleton, and the subsequent elimination reaction that constructs alkylidene unit.

When BF_3•OEt_2 was employed as a catalyst for the vinylogous Mukaiyama aldol reaction, syn-isomer was the major product. The selectivity of the subsequent base-catalyzed elimination reaction was improved by using *t*-BuOK. Final deprotection of TBDPS group afforded respective hygrophorone F and G.

butenolide, aldol reaction, elimination reaction

講演番号：4F02-06
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:30～ ミーティングルーム F

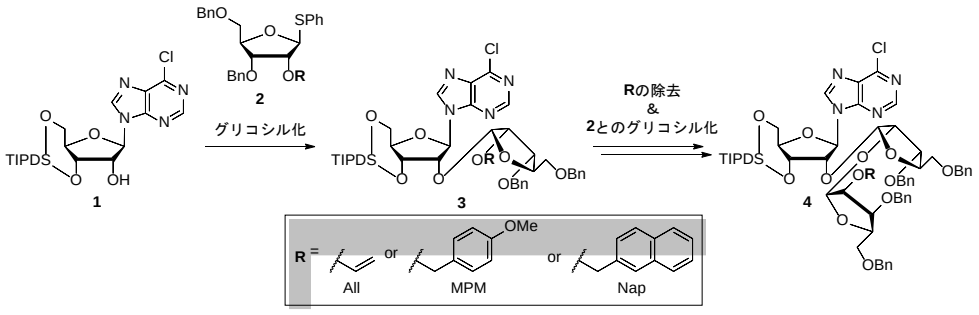
ポリ ADP リボース分岐構造の合成

Synthesis of the branching structure of poly-ADP-ribose

○茂﨑 恵太[1]、萩野 瑠衣[1]、河村 奈緒子[2,3]、安藤 弘宗[2,3]、田中 秀則[2,3]([1]岐阜大・応用生物、[2]岐阜大・G-CHAIN、[3]東海国大機構・iGCORE)
○Keita MOZAKI[1], Rui HAGINO[1], Naoko KOMURA[2,3], Hiromune ANDO[2,3], Hide-nori TANAKA[2,3]
([1]Dept. Appl. Bioorg. Chem. Gifu Univ., [2]G-CHAIN, Gifu Univ., [3]iGCORE, THERES)

【背景】タンパク質の翻訳後修飾である ADP リボシル化は、ADP リボースをニコチンアミドアデニンジヌクレオチド（NAD^+）からタンパク質のアミノ酸残基に転移させる反応であり、様々な生命現象に関与している（Ahel *et al. Open Biol.* **2019**）。近年 ADP リボシル化修飾の重要性が認識されつつあるが、本翻訳後修飾によるタンパク質機能発現の詳細な分子メカニズムは明らかになっていない。ADP リボース分子の量的供給がその妨げになっているため、有機合成による化合物供給が望まれているが、未だ ADP リボース分子の効率合成法は確立されていない。【目的】本研究では、ボトルネックとなっている合成技術の向上を目的とし、結合形成が難しい二つの連続する α-*O*-グリコシド結合を持つポリ ADP リボース分岐構造の化学合成に挑戦する。【方法】アデノシン受容体を用いる *O*-グルコシル化反応では、電子豊富なアデニンで *N*-グリコシル化が進行することが報告されている（Filippov *et al. Org. Lett.* **2011**）。そこで我々は、アデニンの代わりに塩基の求核性を低下させたクロロプリンに置換した受容体 **1** を利用する合成法を立案した。すなわち、2′位水酸基遊離の **1** と化学選択的に除去可能な保護基 **R** を **2** 位に有するリボース供与体 **2** との縮合反応により、α-*O*-グリコシド結合を形成する。続いて、グリコシド成績体の 2″位保護基 **R** の除去、再度 **2** との α-*O*-グリコシル化により、ポリ ADP リボース分岐構造の骨格構築を達成する。【結果】保護基 **R** に All 基、MPM 基、Nap 基を有する三種類のリボース供与体 **2** を合成し、それぞれ一当量用いてビスマス活性化剤（Pohl *et al. Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**）存在下で **1** との *O*-グリコシル化反応に供した。その結果、**2** の Nap 体が最も適した供与体であることを見出し、三当量用いた場合にグリコシド成績体 **3** を収率 66%で高 α 選択的に得ることに成功した。2″位 Nap 基を除去した後、続く **2** との *O*-グリコシル化反応も良好な収率且つ α 選択的に進行し、ポリ ADP リボース分岐構造骨格 **4** の構築に成功した。現在、最終脱保護を試みている。

In order to elucidate ADP-ribosylation functions at the molecular level, chemical synthesis of ADP-ribosylated molecules has been in highly demand. Here we develop a concise synthetic route to the branching structure of poly-ADP-ribose with two consecutive α-*O*-glycosidic linkages, A-α(2′→1″)-Rib-α(2″→1‴)-Rib. Use of 6-chloropurine riboside acceptor **1** and Nap-protected ribosyl thioglycoside donor **2** allowed for high yielding and α-selective *O*-glycosylation.



branching structure of poly-ADP-ribose, α-glycosylation, Nap protect

発表責任者：田中秀則（htanaka@gifu-u.ac.jp）

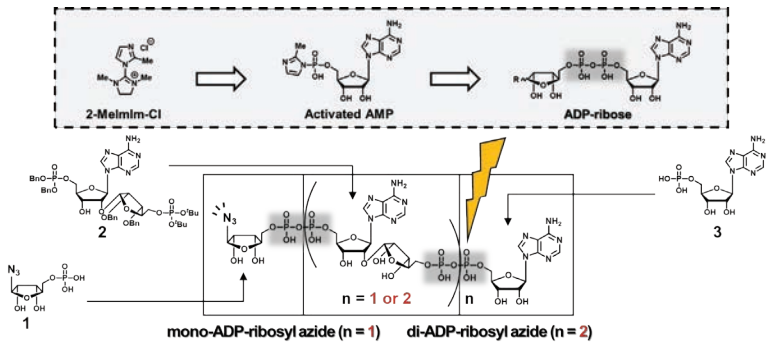
講演番号：4F02-07
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:30～ ミーティングルーム F

リン酸クロスカップリング反応を鍵とした ADP リボース clickable 分子の高効率合成

Highly efficient synthesis of ADP-ribosyl clickable molecules via phosphate cross coupling

○萩野 瑠衣[1]、河村 奈緒子[2,3]、安藤 弘宗[2,3]、田中 秀則[2,3]（[1]岐阜大・応用生物、[2]岐阜大・G-CHAIN、[3]東海国大機構・iGCORE）
○Rui HAGINO[1], Naoko KOMURA[2,3], Hiromune ANDO[2,3], Hide-Nori TANAKA[2,3] ([1]Dept. Appl. Bioorg. Chem., Gifu Univ., [2]G-CHAIN, Gifu Univ., [3]iGCORE, THERS)

【背景】翻訳後修飾の 1 つである ADP リボシル化は、ADP リボースを酸化型 NAD からタンパク質に転移させる反応であり、DNA 修復や転写制御など様々な細胞プロセスに関与している。これまで ADP リボシル化修飾の重要性は広く研究されてきたが、本翻訳後修飾によるタンパク質機能発現の詳細な分子メカニズムは明らかになっていない。本研究領域の進展の妨げとなっているのが、天然から構造明確な ADP リボース分子を研究試料として供給することが難しいことが挙げられる。このような背景の中、近年 Filippov らは ADP リボース合成研究を精力的に行っており、ホスホロアミダイト法によるピロリン酸結合形成を鍵反応としてオリゴ ADP リボースの化学合成を達成した（Filippov *et al. Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**）。本報告は ADP リボース合成研究の先駆的成果であるが、合成効率にやや問題を抱えていた。【目的】本研究では、リン酸クロスカップリング反応を鍵とした、ADP リボース単量体及び二量体アジドアナログの高効率合成を達成する。本研究で合成するアジドアナログ体はクリック反応で様々な機能性分子への誘導が可能である。【方法】**1**、**2**、**3** をビルディングブロックとし、リン酸クロスカップリング反応による連結で ADP リボース単量体および二量体アジドアナログの高効率合成を達成する。リン酸クロスカップリング反応には、既知のリン酸基活性化剤（Hindsgaul *et al. Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**）の加水分解耐性を向上させた 2-MeImIm-Cl を利用する。【結果】2-MeImIm-Cl でリン酸基を化学選択的に活性化させた **3** を **1** とのリン酸クロスカップリング反応に伏すことで、単量体アジドアナログの無保護合成を達成した。現在、ADP リボース二量体アジドアナログの高効率合成を試みている。



ADP-ribosylation, one of post-traslational modifications, plays an important role in a variety of cellular processes including DNA repair and transcriptional regulation. Its biological importance has widely been investigated, however, detail functions remain poorly understood. Here we report a straightforward method for synthesis of mono- and di-ADP-ribosyl azide through pyrophosphate formation by phosphate cross-coupling reaction. The azide-functionalized molecules can conjugate with peptides and dyes by click reations.

ADP-ribosylation, phosphate cross coupling reaction, clickable molecules

発表責任者：田中秀則（htanaka@gifu-u.ac.jp）

講演番号：4F02-08
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:30～ ミーティングルーム F

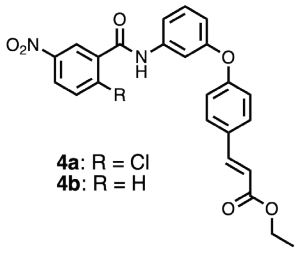
共有結合型 PPARγリガンドとその類縁化合物による抗炎症活性の検証

Effect of a covalent PPARγ ligand and its analogue compound on inflammatory pathway

○大前 勇馬[1]、礒田 博子[2,3]、宮前 友策[2]([1]筑波大院・グローバル教育院、[2]筑波大・生命環境、[3]筑波大・北アフリカ)
○Yuma OMAE[1], Hiroko ISODA[2,3], Yusaku MIYAMAE[2] ([1]Univ. Tsukuba, SIGMA, [2]Univ. Tsukuba, FLES, [3]Univ. Tsukuba, ARENA)

肥満に伴う脂肪細胞の肥大化は、マクロファージにおける TNF-α や IL-6 などの炎症性サイトカインの発現を促し、インスリン抵抗性ならびに II 型糖尿病の発症を引き起こす。ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体γ（PPARγ）は核内受容体の一種であり、リガンド依存的な転写因子である。PPARγリガンドは、糖代謝関連遺伝子の転写を直接的に誘導するだけでなく、NF-κB による炎症応答遺伝子の転写制御を負に調節する作用を示すことから、II 型糖尿病における創薬リードとして期待されている。本研究では、演者らのグループが過去に合成した[1–4]共有結合型 PPARγリガンド **4a** ならびにその類縁化合物である **4b** を用いて、抗炎症性効果の検討を行った。

まず、NF-κB 応答配列をルシフェラーゼ遺伝子に接続したレポータープラスミドをヒト肝がん細胞株 HepG2 に発現させ、NF-κB による転写制御に与える影響を評価した。その結果、TNF-α 刺激により誘発された NF-κB の転写活性が、ligand **4a** および **4b** の処理により抑制され、PPARγアンタゴニストである GW9662 の共処理により打ち消されたことから、両化合物は PPARγ依存的に NF-κB の転写活性を抑制することが明らかになった。また、マウス由来マクロファージ細胞である Raw264 細胞を用いて、炎症マーカーである一酸化窒素(NO)分泌量を測定したところ、LPS 刺激により増大した NO 分泌量が、両化合物の処理により有意に減少した。さらに、IL-6 分泌量を ELISA により測定した結果、LPS 刺激により増大した IL-6 分泌量が、**4a** の処理により減少した一方、 **4b** では有意な減少が見られなかった。以上より ligand **4a** および **4b** 共に PPARγ依存的に抗炎症作用を示す一方、PPARγに対する共有結合能の有無により、発現制御するサイトカインの種類や抗炎症メカニズムが異なる可能性が示唆された。



Obesity and type 2 diabetes are serious diseases in worldwide and closely correlates with inflammatory pathway. Peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPARγ) is a member of nuclear receptor superfamily that regulates adipogenesis, glucose metabolism and inflammation. Previously, our group synthesized a new-type of covalent PPARγ agonist using fragment compounds which identified by a cell-based screening system [1–4]. Here we report the ability of synthesized covalent ligand and its derivative to regulate inflammatory pathway including NF-κB transcription, NO production and expression of pro-inflammatory cytokines.

1) Ohtera *et al*., *ACS Chem. Biol.*, 2015, 2) Utsugi *et al*., *Molecules*, 2019, 3) 宮前ら、日本農芸化学会 2015 年度大会, 4) 宇津木ら、日本農芸化学会 2020 年度大会

PPARγ, covalent ligands, inflammation

発表責任者：大前勇馬（s1921664@s.tsukuba.ac.jp）

講演番号：4F02-09
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:30～ ミーティングルーム F

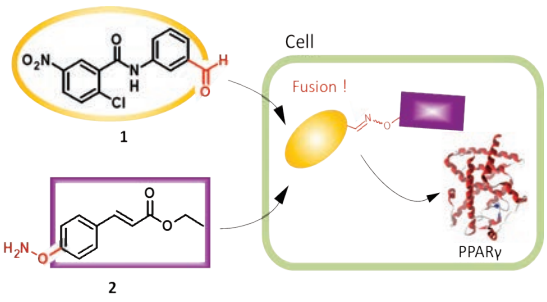
生体直交型反応を示す官能基を付加した PPARγ リガンドの合成と活性評価

Synthesis and biological evaluation of PPARγ ligands that bear bioorthogonal functional groups

○安 彩伽[1]、大前 勇馬[2]、有本 光江[3]、加香 孝一郎[4]、礒田 博子[4,5]、深水 昭吉[6]、繁森 英幸[4,7]、宮前 友策[4]（[1]筑波大院　生命環境、[2]筑波大院　グローバル教育院、[3]筑波大　生命環境系技術室、[4]筑波大　生命環境系、[5]筑波大　地中海・北アフリカ、[6]筑波大　TARA セ、[7]筑波大　MiCS）
○ Ayaka YASU[1], Yuma OHMAE[2], Mitsue ARIMOTO[3], Koichiro KAKO[4], Hiroko ISODA[4,5], Akiyoshi FUKAMIZU[6], Hideyuki SHIGEMORI[4,7], Yusaku MIYAMAE[4] ([1]Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, [2]SIGMA, Univ. Tsukuba, [3]Tech. Svc. Off. for Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, [4]Fac. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, [5]ARENA, Univ. Tsukuba, [6]TARA, Univ. Tsukuba, [7]MiCS, Univ. Tsukuba)

PPARγ（ペルオキシソーム増殖剤応答性受容体ガンマ）は糖代謝や脂質生成に関与する核内受容体型転写因子であり、糖尿病の創薬標的分子の一つである。当研究グループでは、以前、PPARγ のリガンド結合ポケット（LBP）の特徴を活かした新規リガンド探索法を考案し、共有結合型 PPARγ アゴニストの開発に成功した[1)-4)]。本手法は、LBP 内部の競合しない部位に同時に結合し、協調的な活性化を示すリガンドのペアを同定した後、両者の構造を融合させた単一の化合物を設計、合成することに基づく。本研究では、本法のさらなる利便性の向上を目指し、見出したリガンドペアに生体直交型反応を示す官能基を付加した化合物の合成および活性評価を目的とした。先行研究で見出した、不可逆的アンタゴニストである GW9662 および 4-メトキシけい皮酸エチルのそれぞれの部分構造を、アルデヒドならびにアミノオキシ基に置換した化合物 **1** および **2** を合成した。合成した化合物の PPARγ 活性化能を、GAL4-UAS システムを用いたルシフェラーゼレポーターアッセイにより評価したところ、**1** および **2** の共処理で転写活性が顕著に増大した。また、**1** を前処理の後、**2** を添加した際も同様の活性化が見られた。現在、PPARγ の LBP 内部で **1** および **2** の融合化合物が生成されているか、MALDI-TOF MS を用いて検証を行っている。

PPARγ (peroxisome proliferator-activated receptor gamma) is a transcription factor that is member of the nuclear receptor superfamily. Previously, our group reported a two-step strategy to develop PPARγ ligand: first, a pair of compounds that cooperatively activate PPARγ transcription was identified, then, a single compound with their hybrid structure was designed and synthesized. By using this strategy, we successfully synthesized a covalent PPARγ agonist with hybrid structure of GW9662, an irreversible PPARγ antagonist, and 4-methoxy cinnamic acid ethyl ester [1)-4)]. To improve a synthetic accessibility and bioavailability of designed hybrid ligand, we synthesized compounds that bear bioorthogonal functional groups. In this talk, biological evaluation by using cell-based assay and MALDI-TOF MS will also be reported.



1) Ohtera, *et al.*, *ACS Chem. Biol.* 2015, 2) Utsugi *et al.*, *Molecules* 2019, 3) 宮前ら，日本農芸化学会 2015 年度大会, 4) 宇津木ら，日本農芸化学会 2020 年度大会

PPARγ, Bioorthogonal functional groups, Covalent ligand

発表責任者：宮前友策（miyamae.yusaku.fw@u.tsukuba.ac.jp）

講演番号：4F02-10
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:30～ ミーティングルーム F

蛍光標識化 TAK779 類縁体の合成と CCR5 結合アッセイに関する研究

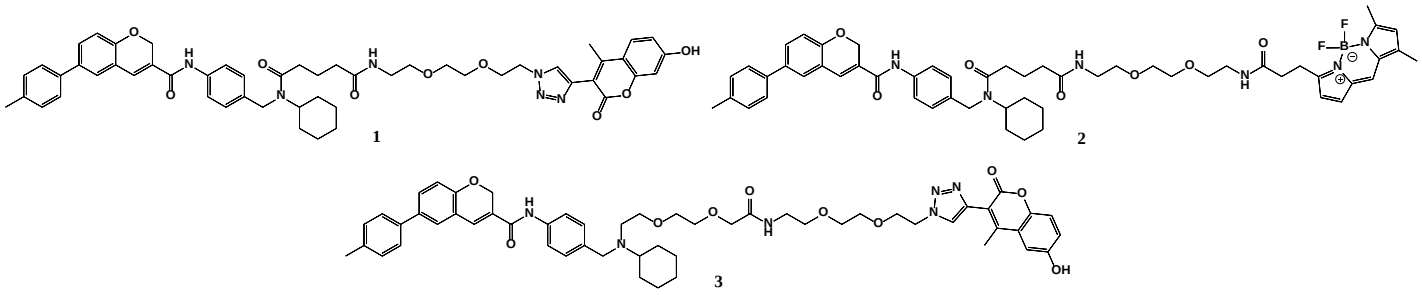
Synthesis of fluorescently labeled TAK779 analogs and it's CCR5 binding assay

○青田 太一、齋藤 拓也、横山 智哉子、今野 博行（山形大院理工）
○Taichi AOTA, Takuya SAITO, Chikako YOKOYAMA, Hiroyuki KONNO (Yamagata Univ.)

CCR5 はヒト免疫不全ウイルス（HIV）が宿主に侵入する際に利用するケモカインレセプターであり、その阻害剤は HIV の根本的治療薬として注目されている。現在、CCR5 阻害剤の評価には放射線同位体が用いられており専門的な設備を必要とする。そこで本研究ではより簡便な評価方法の開発を目的として、蛍光標識化した CCR5 阻害剤を合成し評価することにした。CCR5 阻害骨格には強力な阻害能を有する TAK779（IC_{50} = 1.4 nM）の類縁体を用い、蛍光色素を PEG リンカーで連結し、プローブ **1**, **2** 及び **3** として設計した。合成したプローブはいずれも K562 細胞に対し毒性を示さないことを確認し、CCR5 が発現した K562 細胞及び発現していない HeLa 細胞を用いて結合実験の様子を蛍光顕微鏡で観察した。その結果これらの化合物はいずれも細胞膜を透過していることが分かった。現在、膜透過性を抑制した **3** のアンモニウム塩の合成及び評価が進行中である。

CCR5 is a chemokine receptor used for fusion of HIV and host cell. In this study, we planned to synthesize a fluorescent labeled CCR5 inhibitor to use the imaging study. Probes **1**, **2** and **3** were designed using TAK779 (IC50 = 1.4 nM) as the CCR5 antagonist, coumarin and PEG linker. Desired molecules **1**, **2** and **3** were synthesized and evaluated the cytotoxicity against K562 cells. Thus these compounds **1-3** showed no cytotoxicity, binding study between synthetic compounds and K562/CCR5 were performed and observed by fluorescence microscope. As a result, it was found that these compounds permeate the cell membrane. Synthesis of a modified compound as an ammonium salt is now underway for the suppression of membrane permeability.

1) Shiraishi, M *et al., J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 2049-2063.



CCR5 inhibition, fluorescent probe, TAK779

発表責任者：青田太一（twh06373@st.yamagata-u.ac.jp）

講演番号：4F02-11
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:30～ ミーティングルーム F

ブラリナトガリネズミ由来の神経毒ペプチド BPP 類の合成研究

Synthetic studies on the neurotoxic peptides from the short-tailed shrew *Blarina brevicauda*

○矢野 佑介、Maturana Andres D.、森田 真布、北 将樹（名大院生命農）
○Yusuke YANO, Andres D. MATURANA, Maho MORITA, Masaki KITA (Nagoya Univ.)

BPP (Blarina Paralytic Peptide) 1, 2 は、北米に生息する食虫動物ブラリナトガリネズミ (*Blarina brevicauda*) の顎下腺より単離された新規神経毒ペプチドである。BPP 1, 2 はそれぞれ 48, 53 残基のアミノ酸から構成される一本鎖ペプチドである。また BPP 2 は、痛みに関与する N 型 Ca^{2+}チャネル開口活性を示すことも明らかとなっている。BPP 類はヒトオピオイド前駆体タンパク質シンエンケファリンに類似したペプチドであり、その高次構造も似ていると予想している。一方で BPP 類には 3 組のジスルフィド結合が存在するが、その結合様式は未決定である。

そこで我々は、予想される高次構造の BPP 類を化学合成し、それらの生物活性評価と酵素消化によって得られる断片ペプチドの解析により、天然品の構造と機能を解明することを目指すこととした。これまでに BPP 2 の N 末端側ヒドラジドフラグメント (22 残基) と無保護の C 末端側フラグメント (31 残基)を調製し、アシルピラゾールを経由した NCL 法により 5 つの Cys 残基を Acm 基で保護した S(Acm)-BPP 2 を合成した。現在、Acm 基の除去とジスルフィド結合形成反応について検討している。

BPPs 1 and 2 are neurotoxic peptides isolated from the short-tailed shrew *Blarina brevicauda*. Among them, BPP 2 shows channel opening activity toward N-type voltage-gated Ca^{2+} channels. Although the amino acid sequences of BPP 1 (48 aa) and BPP 2 (53 aa) have been established, their three disulfide bond patterns have not been determined. Since the primary sequences of BPPs are similar with human opioid precursor protein, synenkephalin, we proposed the disulfide bond patterns of BPPs based on that of synenkephalin.

To confirm the structure and activity of BPPs, we have examined chemical synthesis of BPPs. The N-terminal fragment which has acyl hydrazide (22 aa) and C-terminal fragment (31 aa) of BPP 2 were synthesized. Then these fragments were coupled by the NCL method through the acyl pyrazole intermediate to afford S(Acm)-BPP 2. Removal of Acm groups and formation of three disulfide bonds of BPP 2 is currently underway.

mammalian venom, neurotoxic peptide, peptide synthesis

発表責任者：北 将樹（mkita@agr.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：4F02-12
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:30～ ミーティングルーム F

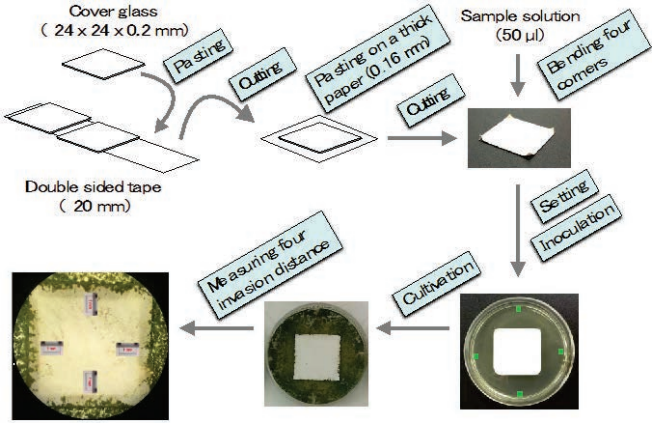
防カビ剤の新規な定量法「菌糸侵入距離法」

Mycelial invasion distance method for the estimation of anti-fungal substances

○小田 忍、佐藤 紅空（金沢工大ゲノム研）
○Shinobu ODA, Kurea Satoh (Kanazawa Inst. Technol.)

寒天平板から試験板表面へのカビ気中菌糸の侵入距離を計測する「菌糸侵入距離法」（特許第 6411803 号）は、撥水性塗板などの固体表面の防カビ性能を正確に評価できるバイオアッセイ法である。本研究では、上記の菌糸侵入距離法を防カビ剤の力価判定に応用する新規なバイオアッセイ法の確立を目的とした。

本アッセイ系のプロトコルを右図に示す。裏面にカバーガラスを貼付した厚紙に paraben 溶液 50 µl を含浸させ、カバーガラス面を下にして potato-dextrose agar（PDA）表面に設置した。試験片各辺に面した内壁側 4 点にカビマットの小片を植え、25 °C で所定時間培養した後、試験片上に侵入した菌糸の距離を実体顕微鏡下、マイクロルーラーを用いて計測した。



Trichoderma atroviride NBRC 100586、*Chaetomium globosum* NBRC 6347、*Lichtheimia blakesleeana* ATCC 10148b、*Rhizopus oryzae* NBRC 31005 とも、パラベンの log *P* 値が低いほど、またパラベンのチャージ量が多いほど菌糸の試験片上への侵入距離は小さく、強い防カビ性が確認された。例えば、*C. globosum* NBRC 6347 に対する methyl paraben（log *P* = 1.96）の MIC 値が 0.06 mg/cm^2-paper であるのに対し、benzyl paraben（log *P* = 3.97）のそれは 1.76 mg/cm^2-paper となった。

本手法は既知の固体表面の防カビ性能評価法である菌糸侵入距離法を防カビ剤の力価判定に応用した、簡便かつ有効な新規バイオアッセイ法であると期待できる。

Mycelial invasion distance method (Japanese patent application No. 6411803) for the estimation of anti-fungal activity of solid surface was applied to the determination of titer of anti-fungal substances. The mycelial invasion of four fungi such as *T. atroviride* NBRC 100586 was depended on log *P* value and content in a test paper of *p*-hydroxybenzoate esters (parabens). The higher the pH value and the content, the shorter the invasion distance were observed.

This bioassay may be useful for the estimation of anti-fungal activity of many substances.

anti-fungal activity, antibiotic activity, fungal mycelia

発表責任者：小田　忍（odas@neptune.kanazawa-it.ac.jp）

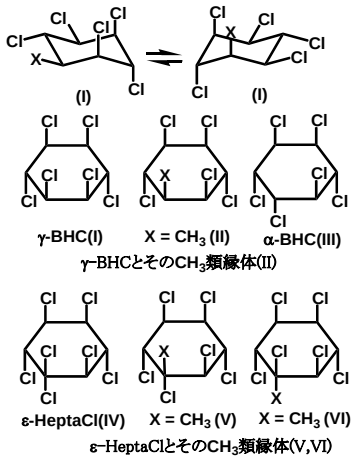
講演番号：4F02-13
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:30～ ミーティングルーム F

γ-BHC およびε-Heptachlorocyclohexane のメチル基置換類縁体の殺虫活性と GABA アンタゴニスト活性

Insecticidal and GABA antagonist activities of γ-BHC and ε-Heptachlorocyclohexane analogues with an additional methyl group

○田中 啓司[1]、尾添 嘉久[2]、赤松 美紀[3]、松田 一彦[1]([1]近畿大農、[2]島根大生物資源、[3]京都大農)
○Keiji Tanaka[1], Yoshihisa Ozoe[2], Miki Akamatsu[3], Kazuhiko Matsuda[1] ([1]Kindai Univ., [2]Shimane Univ., [3]Kyoto Univ.)

一般に、有機塩素系化合物は難分解性で、腐植やタンパク質に対し強く結合することから残留性が高いと見なされ、POPs（難分解性化合物）に指定されている化合物に有機塩素系化合物が多い。疎水的で、分配係数も大きいことがその主な理由の一つであるとして議論されている。γ-BHC(I)骨格上の塩素原子（Cl）を種々の原子や置換基（X 基）で置換した類縁体の殺虫活性と置換基の各種種パラメータを用いた構造活性相関研究から、作用発現（基質特異性や分子認識）には、置換基の疎水性ではなく、そのサイズ（大きさ）が重要であるとの結論であった。CH_3 基で置換した類縁体（II）は高い殺虫活性ではあったが、γ-BHC(I)に比べ少し劣ることが報告されている [1)]。今回、γ-BHC(I) やε-Heptachlorocyclohenxane（ε-HeptaCl）(IV)の CH_3 類縁体(V,VI)の殺虫活性（代謝阻害剤を投与下条件で）や、γ-BHC(I)の CH_3 類縁体(II）の殺虫活性（代謝阻害剤を投与下条件で）や、GABA 受容体に対するアンタゴニスト活性を調べた結果、いずれも高い活性を維持しているが、γ-BHC(I)に比べ明らかに劣る結果であった。ε-HeptaCl(IV)は、*gem* の Cl 原子が結合している部分に関して、α-BHC(III)とγ-BHC(I) のハイブリッド構造を有しているが、その *gem* の Cl 原子を CH_3 基に置換した類縁体（V,VI)はα-BHC(III)やε-HeptaCl（IV）とほぼ同程度の活性であり、BHC 骨格上の Cl 基の意味を考えるうえで、非常に興味のある結果であった。γ-BHC が GABA 受容体に結合する際の基質特異性や分子認識を考察する上での Cl 原子の役割に関して極めて興味ある情報を提示している。



In general, organochlorine compounds are persistent and are considered to have high persistency because they bind strongly to humus and proteins. It is argued that one of the main reasons is their hydrophobicity and their high log P values. γ−BHC analog (II) substituted with CH_3 group was reported to have high insecticidal activity, but its activity was slightly inferior to γ−BHC(I). In order to pursue the role of Cl atom on BHC analogues, the insecticidal and GABA antagonist activities of CH_3 analogs (II, V, VI) of γ –BHC（I） and ε−HeptaCl (IV) were studied. Those of analogues (II, V, VI) were clearly inferior to those of γ –BHC (I).

1) Pestic. Biochem. Physiol., 8, 33-43 (1978); M.Kiso, et al. Insecticidal and GABA antagonist activities of γ-BHC-CH3 analogue

BHC, GABA, Insecticidal　activity

発表責任者：Keiji Tanaka（tkeiji@nike.eonet.ne.jp）

講演番号：4F02-14
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:30～ ミーティングルーム F

pH 低下による塩基性両親媒性構造の減少が抗マラリア薬耐性の原因である
A decrease in cationic amphiphilic structure of antimalarial drugs by a slight drop in pH is responsible for the resistance
○上園 幸史、北川 智久、松本 惇志、寺島 一郎（東京大学）
○yukifumi UESONO, tomohisa KITAGAWA, atsushi MATSUMOTO, ichiro TERASHIMA (The University of Tokyo)

キナクリン（QC）やクロロキン（CQ）は抗マラリア薬として開発されたが、熱帯熱マラリアなど特定の原虫には効果がなく耐性とされる。また、抗菌、抗ウィルスや免疫抑制作用も知られるが、その機構は未だに解明されていない。計算化学による構造推定と蛍光解析から、これらの薬剤にはプロトン化される窒素が２つあり、pH 上昇に伴う脱プロトン化で、親水性(HP)型、塩基性両親媒性薬剤(CAD)型、脂溶性（LP）型へと変化する事がわかった。HP 型 QC を形成する pH5 では出芽酵母への抗菌作用はないが、pH6 以上で抗菌作用を示し、pH 上昇に応じた CAD 型の増加で抗菌作用は指数的に増強した。pH7.5 での CAD 型 QC は酵母の膜系にも局在し、単糖取込みを非競争的に阻害して糖飢餓を誘発した。したがって、CAD 型 QC は同じ両親媒性構造の細胞膜に非特異的に作用し、単糖輸送体機能を基質認識以外の部位で阻害すると考えられる。pH による CAD 型増加に応じた指数的な抗菌作用の増強は CQ でも確認できたため、これら抗マラリア薬の薬理作用には CAD 構造が重要と結論した。QC と CQ の CAD 構造は pH7.4 からのわずかな低下で減少し、抗菌作用が大きく低下する。このため、これらの抗マラリア薬は体液の酸性化症状を伴う熱帯熱マラリアや COVID-19 肺炎患者では薬効を失い、見かけ上耐性になると考えられる。キノリン系抗マラリア薬群の pH による CAD 型の比率変化と薬剤耐性について考察する。

Quinacrine (QC) and chloroquine (CQ) have antimicrobial and antiviral activities as well as antimalarial activity, although the mechanisms remain unknown. QC increases the antimicrobial activity against yeast exponentially with a pH-dependent increase in the cationic amphiphilic drug (CAD) structure. CAD-QC localizes in the yeast membranes and induces glucose starvation by noncompetitively inhibiting glucose uptake. A logarithmic increase in antimicrobial activity with pH-dependent CAD formation was also observed for CQ, indicating that the CAD structure is crucial for its pharmacological activity. A decrease in CAD structure with a slight decrease in pH from 7.4 greatly reduced their effects; namely, these drugs would inefficiently act on falciparum malaria or COVID-19 pneumonia patients with acidosis, resulting in resistance. The decrease in CAD structure at physiological pH was not observed for quinine, primaquine, and mefloquine. Therefore, recovering normal blood pH or using pH-insensitive quinoline drugs might be effective for these infectious diseases with acidosis.

yeast, glucose transporter, structure-activity relationship

発表責任者：上園幸史（uesono@bs.s.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：4F02-15
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:30～ ミーティングルーム F

膜透過性環状ペプチドの新規スクリーニング法の有用性の検証

Utility verification of new screening method of cyclic peptides with high membrane permeability

○井上 雄介、稲垣 穣、増田 裕一（三重大生物資源）
○Yusuke INOUE, Minoru INAGAKI, Yuichi MASUDA (Mie Univ.)

細胞膜透過性が高い環状ペプチドは、細胞内標的を狙える新規創薬シードとなり得ることから、その効率的な探索法の開発が望まれている。我々はこれまで、環状ヘキサペプチド PF1171F (図 1) の高膜透過性類縁体を探索するため、類縁体 125 種類の混合物を並行合成し、人工リン脂質膜を透過した類縁体の量と配列を LC-MS および LC-MS/MS でそれぞれ解析した。膜透過後の溶液に含まれる類縁体の量を MS のイオン強度から算出した結果、分子量 660–680 の類縁体が多く含まれることが分かった。しかしながら、類縁体の合成収率やイオン化効率の違いが定量性に影響することが考えられた。

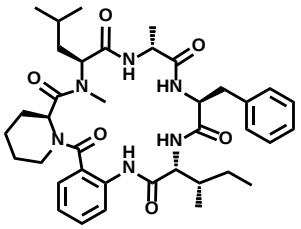


図 1. PF1171F の化学構造

本研究では、個別に合成した類縁体 11 種類の合成収率、膜透過性、イオン化効率を調べた。その結果、分子量 660–680 の類縁体は、実際に人工リン脂質膜の透過性が高かったことから、我々が行った方法により膜透過性環状ペプチドを探索できることが示された。

Cyclic peptides with high membrane permeability can be new drug seeds targeting intracellular biomolecules. Hence, it is desired to develop an efficient method of screening membrane permeable cyclic peptides. To screen high-membrane permeable analogues of a cyclic hexapeptide PF1171F (Figure 1), mixture of 125 analogues was synthesized and subjected to artificial phospholipid membrane permeability assay, then the amount and the sequence of the analogues were analyzed by LC-MS and LC-MS/MS respectively. The amount of each analogue in the permeated solution was calculated based on ion intensity in MS. The analogues with Mw 660–680 were suggested to be high membrane-permeable. However, the differences of the yield and the ionization rate could bias the quantitativeness.

We investigated the synthetic yield, membrane permeability, and the ionization rate of 11 kinds of respectively synthesized analogues. The analogues with Mw 660–680 showed high artificial phospholipid membrane permeability. Therefore, our method was revealed to be able to screen cyclic peptides with high membrane permeability.

membrane permeability, cyclic peptide, LC-MS/MS

発表責任者：増田裕一（masuda@bio.mie-u.ac.jp）

講演番号：4F02-16
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:30～ ミーティングルーム F

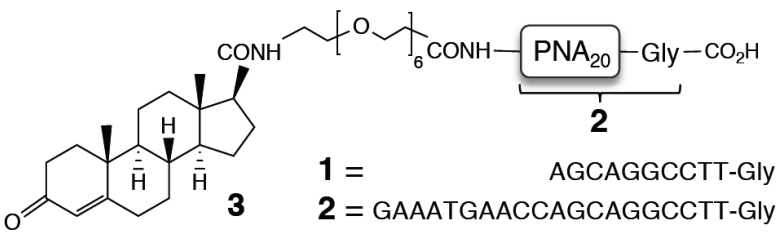
アンチセンス治療を指向した長鎖ペプチド核酸の合成研究

Synthetic studies on long peptide nucleic acid and its conjugates toward antisense therapy

○村上 一馬[1]、八木田 凌太郎[1]、池田 壽文[2]、入江 一浩[1] ([1]京大農、[2]東京家政大)
○Kazuma Murakami[1], Ryotaro Yagita[1], Hisafumi Ikeda[2], Kazuhiro Irie[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Tokyo Kasei Univ.)

近年，標的 mRNA の機能を特異的に抑制するアンチセンス核酸 (ASO) は新しい創薬モダリティーとして注目されている．ASO は，20~40 塩基からなるオリゴヌクレオチドであり，安価に合成できるが，同じく中・高分子医薬であるペプチドや抗体に比べて，生体内での安定性（分解酵素に対する耐性）に劣る. ASO 配列の主鎖を, 安定なアミド結合に置換したペプチド核酸 (PNA) は強力な分解耐性を示すが，20 残基以上の高純度合成例はない．本研究では，固相合成機における縮合剤（Oxyma の採用），洗浄条件（CH_2Cl_2/DMF の追加），核酸モノマーの溶媒（DMF の代わりに NMP を使用）および固相担体（TentaGel の使用）を改善することで 10 および 20 残基以上の長鎖 PNA (**1**, **2**) ならびにステロイドとの複合体 (**3**) を高純度かつ高収率で得た．**2** はエキソヌクレアーゼ I に対して高い分解耐性を示した．また融解温度測定より，**2** および **3** は DNA 相補鎖に対して T_m 値が 20~30℃増大したから，ペプチド鎖に変えることで高い熱安定性を得られることがわかった．得られた知見は，核酸アプタマーなどの核酸医薬のバイオアベイラビリティーの向上につながるものと期待される.[1]

Although peptide nucleic acids (PNAs) have improved nuclease resistance compared with DNA or RNA, it is difficult to synthesize long PNAs because of poor elongation yield. Herein we synthesized 10, 20-mer PNAs (**1**, **2**), targeting mRNA, as well as its conjugate with testosterone 17β-carboxylic acid (**3**), in high purity and yield. This synthesis was conducted on Biotage Initiator+ Alstra microwave peptide synthesizer using Oxyma as a condensation agent, NMP as a solvent for Fmoc-PNA-C(Bhoc)-OH, 50% CH_2Cl_2 in DMF as an additional washing step, and TentaGel as a highly effective solid-phase support. The resistance of **2** to exonuclease I was higher than that of the corresponding RNA. Furthermore, based on the thermal melting curve experiments at 260 nm, the abilities of **2** and **3** to bind to cDNA were stronger than that of the corresponding RNA. These findings lay the basis for the synthesis of long PNA derivatives toward oligonucleotide therapeutics such as RNA aptamer.[1]



[1]Yagita, R. *et al., Tetrahedron Lett.* **2020**, *61*, 151781.

peptide nucleic acid, antisense, modified nucleic acid

発表責任者：村上一馬（murakami.kazuma.4v@kyoto-u.ac.jp）

講演番号：4F04-01
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:30～ ミーティングルーム F

キューバ産植物由来抗炎症物質 jacaranone の構造活性相関および標的分子同定

Structure-activity relationship studies and target molecule identification of jacaranone, an anti-inflammatory compound from the Cuban endemic plant

○蛭川 美奈子、柴田 貴広、森田 真布、北 将樹（名大院生命農）
○Minako HIRUKAWA, Takahiro SHIBATA, Maho MORITA, Masaki KITA (Nagoya Univ.)

炎症は最も知られている生体反応のひとつであり、がんや糖尿病、関節リウマチなどの様々な疾患とも関連している。新しい抗炎症リード化合物の創出とその作用機序解明を目指して、我々は民間伝承薬として知られる植物由来の天然物に注目してきた。キューバ共和国固有の薬用植物ついて抗炎症活性を評価したところ、ノウゼンカズラ科である *Jacaranda arborea* に活性がみられ、そこから活性物質として共役ジエノン構造を有する jacaranone (**1**)を単離した。**1** は既知化合物であったが、LPS で刺激したマウスマクロファージ RAW264.7 および BALB/c マウスの両方において炎症性サイトカイン TNF-α の生産を抑制することを見出した。次いで、**1** およびその誘導体を合成し構造活性相関を調べたところ、Michael アクセプターとしての高い求電子性が **1** の活性発現に重要であることが分かった。さらに、**1** のビオチン誘導体を合成し、RAW264.7 細胞抽出液を用いたアフィニティー精製を行った結果、**1** と共有結合する標的タンパク質 A (41 kDa)を同定した。これまでの進捗を発表する。

Inflammation is one of the most well-known biological responses that relate to various diseases, such as cancer, diabetes, and rheumatism. To develop new anti-inflammatory drug leads and to clarify their mode of actions, we have focused on structurally and functionally unique natural products from plants that have been used as traditional medicines. Guided by the anti-inflammatory activity, a known quinoid, jacaranone (**1**), was isolated from the Cuban endemic plant *Jacaranda arborea*. Compound **1** inhibited the production of a proinflammatory cytokine TNF-α in both LPS-treated murine RAW264.7 macrophages and BALB/c mice. Structure-activity relationship studies using synthetic **1** and its derivatives revealed that the high electrophilicity as a Michael acceptor was essential for the activity. In addition, to identify its target molecules, a biotin derivative of **1** was synthesized. Using this chemical probe, affinity purification from the RAW264.7 cell lysate led to the identification of target protein A (41 kDa), which covalently bound to **1**. Isolation, structure-activity relationship, and mode of action studies of jacaranone (**1**) will be presented.

Natural products, anti-inflammatory activity, structure-activity relationship

発表責任者：北将樹（mkita@agr.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：4F04-02
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:30～ ミーティングルーム F

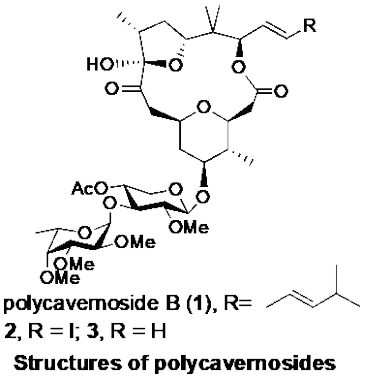
致死性海藻中毒原因物質ポリカバノシド類の作用機序と構造活性相関

Mode of action and evaluation of structure-activity relationship of polycavernosides, the causative toxins of lethal seaweed poisoning

○土肥 裕花[1]、岩崎 浩太郎[2]、佐々木 理[2]、川島 悠岐[2]、島田 紀子[1]、長 由扶子[1]、此木 敬一[1]、佐々木 誠[2]、山下 まり[1] ([1]東北大院農、[2]東北大院生命科)

○Yuka Doi[1], Koraro Iwasaki[2], Satori Sasaki[2], Yuki Kawashima[2], Noriko Shimada[1], Yuko Cho[1], Keiichi Konoki[1], Makoto Sasaki[2], Mari Yamashita[1] ([1]Tohoku Univ. Agr., [2]Tohoku Univ. Life Sciences)

【背景･目的】 ポリカバノシド A, B (PA, PB (**1**))は､カタオゴノリ *Gracilaria edulis* による致死性食中毒 (1991 年、グアム)の原因物質として安元らにより単離、構造決定された [1)]。PA, PB のマウス腹腔内投与毒性は LD_{50} 200–400 μg/kg であり、側鎖の構造や糖部の有無が毒性に影響する。非天然型の合成 PA 類縁体がヒト神経芽細胞腫において、細胞外 Ca^{2+}を細胞内へ流入させ脱分極を誘発することが蛍光法を用いて報告されているが、作用機序の詳細は解明されていない。本研究は、佐々木らが合成した天然型 PB[2)]を用いた作用機序の解明、合成中間体による構造活性相関データ取得を目的とした。



Structures of polycavernosides

【方法】 化学合成された **1**、側鎖にヨウ化ビニル基をもつ PB 類縁体 (**2**)、および **2** から脱ヨウ素化により調製した側鎖にビニル基をもつ PB 類縁体 (**3**) を精製し、定量した。これらをマウス神経芽細胞腫 Neuro2A 細胞と veratridine、ouabain を用いた電位依存性 Na イオンチャネル (Na_v) 阻害剤試験法 (Neuro2A assay) に供して EC_{50} を求め、**1**–**3** の Na_v に対する活性を評価した。また、**1** の Na_v および電位依存性 Ca イオンチャネル($hCa_v1.2$)に対する作用を電気生理実験で調べた。

【結果】 化合物 **2** を脱ヨウ素化し、中程度の収率で **3** を得た。化合物 **1** は Neuro2A assay で阻害活性 (EC_{50} 数 μM) を示したが、電気生理実験では Na_v 阻害作用は見られなかった。一方、**1** は $hCa_v1.2$ を弱く活性化した。構造活性相関では、Neuro2A assay で、**2** は **1** よりやや弱い活性を示し、**3** は **1** の 1/3 以下の活性であった。このことから、活性が側鎖の構造に影響されることが再確認された。

Polycavernoside A, B (PA, PB (**1**)) were isolated as the causative toxins for the fatal human poisoning occurred in Guam in 1991 caused by ingestion of the edible red alga, *Gracilaria edulis*. This study is aimed to elucidate mode of action and structure activity relationship of polycavernosides using totally synthesized PB (**1**) and its analogues (**2**, **3**). The activities of these compounds against voltage-gated sodium channel (Na_v) and/or voltage-gated calcium channel (Ca_v) were investigated. Some of these compounds showed positive results. The results also confirmed that the changes of the structures of the side chain of polycavernosides would influence on their biological activities.

1) Yotsu-Yamashita, M. *et al. J. Am. Chem. Soc*. **1993**, *115*, 1147–1148. 2) Iwasaki, K. *et al. J. Org. Chem.* **2017**, *82*, 13204–13219.

polycavernoside, mode of action, toxin

発表責任者：山下まり（mari.yamashita.c1@tohoku.ac.jp）

講演番号：4F04-03
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:30～ ミーティングルーム F

急性 T リンパ芽球性白血病由来細胞に対する特異的な増殖抑制活性を有する化合物の置換基効果

Substituent effects on compounds with specific growth inhibitory activity against T-cell acute lymphoblastic leukemia-derived cells

○藤田 優希[1,2]、吉田 千紘[1,2]、東 智也[1,2]、鉢呂 佳史[1,2]、中田 千尋[3,4]、八木 拓哉[3,4]、武智 あづさ[3,5]、北田 昇雄[1,2]、小畠 りか[1]、原 孝彦[3,4,5]、牧 昌次郎[1,2] ([1]電通大院・情報理工学、[2]電通大・脳医工学研究センター、[3]都医学研・幹細胞、[4]東京医歯大院・医歯学総合、[5]都立大院・幹細胞制御学)

○Yuki FUJITA[1,2], Chihiro YOSHIDA[1,2], Tomoya HIGASHI[1,2], Yoshihumi HACHIRO[1,2], Chihiro NAKATA1[3,4], Takuya YAGI[3,4], Adusa TAKECHI[3,5], Nobuo KITADA[1,2], Rika OBATA[1], Takahiko HARA[3,4,5], Syoujiro MAKI[1,2] ([1]Dept. of Info. Sci., Grad. Sch., Univ. of Electro-Communications, [2]Center for Neuro Sci. and BioMed. Eng., Univ. of Electro-Communications, [3]Stem Cell Project., Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science, [4]Dept. of Med. and Dent., Univ. of Tokyo Medical and Dental, [5]Grad. Sch. Tokyo Metropolitan Univ)

本研究の目的は、再発率の高い難治性血液疾患である T 細胞性急性リンパ芽球性白血病（T-ALL）患者に特異的な薬剤を合成することである。私たちはこれまでに、天然化学ライブラリーのスクリーニングにより、T-ALL 特異的な増殖抑制活性を示す 2 つの天然化合物を同定しました。その化合物は 44D-L008 と 31D-F005 である。これらの化合物はヒト T-ALL 由来細胞株 CCRF-CEM の増殖を強く阻害したが、B-リンパ腫由来細胞株 Raji の増殖には影響を与えなかった。結果、N-原子を含む複素環とポリエンを有する低分子化合物が T-ALL に対して選択的な増殖阻害活性を有することを発見した。オレフィンを延長することで阻害活性が向上し、ペンタエン以上では細胞選択性を獲得する傾向が見られた。また、Cl をピロール環に置換した場合にも細胞選択性を獲得する傾向が見られた。そこで、Cl との複素環の効果を調べるために、新たな置換基と位置の違いを導入した化合物を合成した。その結果、置換位置によって活性に有意な差があることがわかった。また、置換位置が異なると活性が低下することがわかった。このヘテロサイクルをさらに修飾することで、構造と活性の関係について新たな情報を得ることができた。

The purpose of this study is to synthesize a specific drug for patients suffering from T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL), an incurable blood disease with a high relapse rate. We previously identified two natural compounds exhibiting T-ALL-specific growth inhibitory activity by natural chemical library screening. The compounds are 44D-L008 and 31D-F005. They strongly inhibited the growth of human T-ALL-derived cell line CCRF-CEM, but they did not affect the growth of B-lymphoma-derived cell line Raji. Based on this data, we discovered that small molecular weight compounds having an N-atom-containing heterocycle and a polyene possess the selective growth inhibitory activity on T-ALL.

Inhibition activity improvement by extending the olefin, tend to acquire cell selectivity in pentaene or more was observed. In addition, the tendency of cell selectivity was observed in replacing the Cl with a pyrrole ring. Therefore, in order to investigate the effect of the heterocycle with Cl, we synthesized compounds by introducing a new substituent and difference position. It was found that there was a significant difference in activity depending on the substitution position. And again, different substituents resulted in a decrease in activity. We obtained new information for the structure-activity relationships by further modifying this heterocycle.

Leukemia, cancer, structure activity relationship

講演番号：4F04-04
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:30～ ミーティングルーム F

Pholasin の発現と活性化
Expression and activation of pholasin

○森口 舞子、姜 法雄、久世 雅樹（神戸大農）
○Maiko MORIGUCHI, Bubwoong KANG, Masaki KUSE (Kobe Univ.)

【目的】発光タンパク質（フォラシン）はデヒドロセレンテラジン（DCL）を基質として利用し、活性部位のシステイン残基が DCL と結合したクロモフォア（発光を司る化学構造）を形成し、活性酸素種（ROS）の刺激で発光する。これまで高輝度発光型 DCL の合成を行ってきたが、発光活性測定に用いているフォラシンには天然由来の基質がすでに存在しているため、人工基質の発光活性を正確に評価できないという大きな問題があった。そこで本研究では、天然基質の存在しない完璧なアポタンパク質の調製を目的とした。
【方法・結果】カイコーバキュロウイルス系を用いて遺伝子発現させた組み換えアポフォラシンを調製した。精製アポフォラシンに DCL を加えてフォラシンを再構成した後、過酸化水素ーペルオキシダーゼ（H_2O_2-HRP）混合物を加えて ROS を発生させると、再構成フォラシンを発光させることに成功した。本研究成果は遺伝子発現させたアポフォラシンを光らせることができた世界初の例であり、これにより化学修飾した DCL 誘導体の正確な発光活性の評価を行うことが可能となった。

Pholasin is a photoprotein of *Pholas dactylus* which is postulated to utilize dehydrocoelenterazine (DCL) as an organic substrate and emits light in the presence of ROS. We have synthesized high-intensity luminescent DCL analogs so far. However, there was a problem that the luminescence activity of the artificial substrate could not be evaluated accurately, since the natural abundant substrate already existed in Pholasin® used in the luminescence activity measurement. Therefore, the purpose of this study was to prepare a perfect apoprotein.

Recombinant apopholasin were expressed using a silkworm-baculovirus multigene expression system. Here, the incubation of the recombinant apopholasins with DCL afforded active apopholasin–DCLs. The light emission properties of the apopholasin–DCLs were initiated by addition of a mixture of hydrogen peroxide–horseradish peroxidase (H_2O_2-HRP). This research result is the first example of recombinant apopholasin activated with DCL, which enables accurate evaluation of the luminescent activity by using chemically modified DCL derivatives.

bioluminescence, pholasin, dehydrocoelenterazine

講演番号：4F04-05
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:30～ ミーティングルーム F

Effect of *In Vitro* Digestion on Anti-α-amylase and Antitumor Activities of *Sargassum polycystum* Grown in Cambodia

○Sovannary Un, Quan Nguyen Van, Tran Dang Xuan (Hiroshima University)

Sargassum polycystum is a common brown seaweed species which globally has grown in temperate water. It has been reported that *Sargassum polycystum* contained potential therapeutic agents such as antitumor, antidiabetic, anti-inflammatory, anticancer, antioxidant, and antibacterial. The purpose of this present study was to evaluate the effect of *in vitro* digestion on anti-α-amylase and antitumor activities of *Sargassum polycystum grown in Cambodia. In vitro* digestion method was designed into 3 phases—simulated digestion in the mouth, stomach, and small intestine—based on the human digestive tract model. Among various extracts, hexane extract of *Sargassum polycystum* showed a good inhibition activity on α-amylase enzyme at a value of (IC50 = 0.963 ± 0.048 mg/ml). Therefore, hexane extract was selected to run the column chromatography to separate the potential components. Among 6 fractions, fraction 1 (F1), fraction 2 (F2) and fraction 3 (F3) (undigested phase) were isolated and more effective inhibition activity against α-amylase at (IC50 = 0.358 ± 0.006 mg/ml), (IC50 = 0.758 ± 0.010 mg/ml), and (IC50 = 0.430 ± 0.006 mg/ml) for F1, F2, and F3 respectively compared to the standard Palmitic acid (IC50 = 1.264 ± 0.110 mg/ml). *In vitro* digestion, F1 and F2 in small intestinal phase presented significantly stronger inhibitory activities on α-amylase than F1 and F2 in the undigested phase. Interestingly, *in vitro* digestion process, palmitic acid performed a better inhibitory effect on α-amylase in mouth phase at (IC50 = 0.311 ± 0.015 mg/ml), in stomach phase (IC50 = 0.530 ± 0.004 mg/ml), and in small intestinal phase at (IC50 = 0.461 ± 0.019 mg/ml). The phytochemical compounds of F1, F2, and F3 (undigested phase) identified by gas chromatography-mass spectrometry analysis were classified into different groups of fatty acids, sterol, phytol, and sesquiterpenes. The GC/MS results indicated the presence of fucosterol in both F2 and F3, and palmitic acid in all fractions (F1, F3 and F3). Palmitic acid has been known as α-amylase inhibitor and fucosterol has been reported to have antidiabetic properties. Though the next step result was under antitumor analysis, at the current step it could be concluded that F1, F2, F3 and palmitic acid were affected by the in vitro digestion process. The GC/MS results established the presence of α-amylase inhibitors including fucosterol and palmitic acid.

Sargassum Polycystum, Antitumor, Anti-α-amylase

講演番号：4F04-06
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:30～ ミーティングルーム F

イオンモビリティ MS によるフェアリー化合物の高感度分析

Highly sensitivite analysis of FCs by LC-ESI-MS/MS with differential mobility separation

○謝 肖男[1]、竹原 千恵[1]、崔 宰熏[2,3,4]、呉 静[3]、菅 敏幸[5]、河岸 洋和[2,3,4] ([1]宇都宮大・バイオ、[2]静大院・創造、[3]静大・グリーン研、[4]静大院・総合農、[5]静県大・薬)
○Xiaonan XIE[1], Chie TAKEHARA[1], Jae-Hoon CHOI[2,3,4], Jing WU[3], Toshiyuki KAN[5], Hirokazu KAWAGISHI[2,3,4] ([1]Center for Bioscience Research and Education, Utsunomiya Univ., [2]Graduate School of Science and Technology, Shizuoka Univ., [3]Research Institute of Green Science and Technology, Shizuoka Univ., [4]Graduate School of Integrated Science and Technology, Shizuoka Univ., [5]Department of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka)

芝が輪状に周囲より繁茂あるいは生育抑制され、後にキノコが発生る現象を「フェアリーリング」という。この現象を惹起する３つの物質（AHX、ICA と AOH）はキノコおよび植物から発見され、フェアリー化合物（fairy chemicals, FCs）と呼ばれている。FCs は圃場試験において農作物の収量を大幅に増加し、植物界に普遍的存在しており、新たな植物ホルモンであるとも思われている。植物やキノコに含まれている FCs を正確に定性・定量することは FCs の生合成経路の解明および FCs による農業生産の実用化には不可欠である。しかし、FCs は 200Da 未満の小分子化合物で、微量に存在するため、これまでの分析では植物の抽出物を精製せずに高感度かつ高精度で分析することは極めて困難である。

イオンモビリティスペクトロメトリー質量分析（IMS-MS）は、イオンにおける衝突断面積の差によって、混合物中の化合物を特異的に分離する技術である。われわれの研究グループでは、FC s をより簡便に高感度かつ高精度に分析するため、分析対象である FC s をイオンモビリティにより特異的に識別してから、MS に導入し分析する方法を検討してきた。LC-ESI-IMS-MS/MS で分析した結果、FCs は 50 fg で検出され、わずか 0.5 mg の植物の粗抽出物から FC s を分析可能であった。本発表では、イオンモビリティ MS を用いる、シロイヌナズナ、テフグラスなどの植物からの FC s 分析事例について報告する。

“Fairy rings” is a phenomenon that turfgrass grows more prolific or inhibited than the surrounding area as a ring, and then occasionally mushrooms develop on the ring. The three substances that cause this phenomenon (AHX, ICA and AOH) have been found in mushrooms and plants and are called fairy chemicals (FCs). Microanalyses of FCs have frequently been conducted by using LC- MS/MS. However, crude samples should be purified prior to the analysis to minimize suppression of analyte ionization. Ion mobility spectrometry–mass spectrometry (IMS-MS) is a new technique for separating compounds in a mixture based on the differences in collision cross section of ions. We have developed a highly sensitive and specific analytical method for FCs by LC-ESI-MS/MS with differential mobility separation (DMS). With this analytical method, 50 fg of FCs could be detected and these compounds in 0.5 mg of plant organs could be quantified. Analyses of FCs in Arabidopsis thaliana and Teff plants will be presented.

fairy chemicals, mass spectrometry, ion mobility spectrometry

発表責任者：謝　肖男（xie@cc.utsunomiya-u.ac.jp）

講演番号：4F04-07
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:30～ ミーティングルーム F

ヌメリツバタケモドキ培養物からのがん細胞増殖阻害物質の単離・同定

Identification of compounds inhibitory on proliferation of cancer cells from *Mucidula venosolamellata* culture

井上 裕貴、高橋 賢次、太田 利男、上野 琴巳、○石原 亨（鳥取大農）
Yuki Inoue, Kenji Takahashi, Toshio Ohta, Kotomi Ueno, ○Atsushi Ishihara (Tottori Univ.)

鳥取大学菌類きのこ遺伝資源研究センターでは、きのこから有用生理活性物質を効率的に発見するため、子実体や、液体培養物から抽出物を調製し「きのこ抽出物ライブラリー」を整備している。私たちは、これを活用して、がん細胞増殖阻害物質のスクリーニングを行った。抽出物をメラノーマ細胞（G-361、がん細胞）に投与し、一定時間後に WST-8 を用いて細胞生存率を求め、がん細胞増殖阻害活性を評価した。同時に正常細胞である線維芽細胞（NB1RGB）に対する活性も調べた。スクリーニングの結果、ヌメリツバタケモドキ（*Mucidula venosolamellata*、TUFC30333）の液体培養物に活性が見いだされた。そこで、ヌメリツバタケモドキを大量に培養し活性物質の単離を行った。培養ろ液を酢酸エチルで抽出し、得られた抽出物から、シリカゲルカラムクロマトグラフィー、分取 TLC、分取 HPLC により活性物質を精製した。その結果、２種の化合物が得られた。NMR およびマススペクトルなどの機器分析により、これらの化合物の構造を解析したところ、既知の抗菌活性物質ストロビルリン A および X であった。これらの化合物はメラノーマ細胞の増殖を 25 μg/mL で阻害した。一方、ストロビルリン A は線維芽細胞の増殖を 100 μg/mL で阻害したが、ストロビルリン X は 100 μg/mL でも阻害活性を示さなかった。したがって、いずれの化合物もメラノーマ細胞に対して細胞毒性を有しているが、特にストロビルリン X は、メラノーマ細胞に高い特異的を有することが明らかになった。

For efficient exploration of useful bioactive compounds, the Fungus/Mushroom Resource and Research Center, Tottori University has been developing a mushroom extract library. We performed a screening to find compounds with inhibitory activity to cancer cells by using the library. The activity was evaluated by cell viability determined using WST-8 reagent after an incubation of the cells with the mushroom extract. Melanoma cells (G-361) and fibroblast cells (NM1RGB, normal cells) were used for the bioassay. The screening showed that the extract of culture filtrate of *Mucidula venosolamellata* (TUFC30333) inhibited the proliferation of the melanoma cells. Two active compounds were purified from the culture extract by silica gel column chromatography, preparative TLC, and HPLC with an ODS column. The spectroscopic analyses identified these compounds as stroblurins A and X, the known antifungal compounds. Both compounds were toxic to melanoma cells at 25 μg/mL. Strobilurin A was also toxic to fibroblast cells at 100 μg/mL, while strobilurin X showed no activity on the cells at the same concentration, indicating the selective toxicity of strobilurin X on the melanoma cells.

mushroom, cancer, strobilurin

発表責任者：石原　亨（aishihara@tottori-u.ac.jp）

講演番号：4F04-08
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:30～ ミーティングルーム F

ストレプトグラミン系抗生物質エタマイシン A による抗 MRSE 活性

Anti-methicillin-resistamt *Staphylococcus epidermidis* activity of the streptogramin antibiotic etamycin A

〇小泉 幸央[1]、常盤野 哲生[2]、志村 洋一郎[2]、岩月 正人[3]、久場 敬司[1]（[1]秋田大院・医、[2]秋田県大・生資科、[3]北里大・大村研）

〇Yukio KOIZUMI[1], Tetsuo TOKIWANO[2], Yoichiro SHIMURA[2], Masato IWATSUKI[3], Keiji KUBA[1] ([1]Akita Univ., [2]Akita Pref. Univ., [3]Kitasato Univ.)

近年、多くの国で薬剤耐性菌の増加が問題となっている一方、新規抗菌薬の開発が減少傾向にあることから新しい抗菌薬の開発が望まれている。私たちは新しい抗菌物質の探索を目的に、微生物の培養抽出液を対象としたスクリーニングを行った。秋田県仙北市の土壌から分離した放線菌 AUMR0230 株の培養抽出液に抗菌活性が検出された。AUMR0230 株の培養液から抗菌物質の単離・精製、構造解析の結果、ストレプトグラミン系抗生物質グループ B に属する環状デプシペプチドのエタマイシン A を見出した。エタマイシン A はメチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA）を含むグラム陽性細菌に抗菌活性を示すことがこれまでに報告されている。グラム陰性細菌である大腸菌 *Escherichia coli* に対する最小発育阻止濃度（MIC）は 128 μg/ml 以上だったのに対し、グラム陽性細菌である *Staphylococcus aureus* に対する MIC は 0.5 μg/ml だった。普遍的な常在菌であるが、病院感染の現場で多く遭遇される表皮ブドウ球菌である *S. epidermidis* に対し、1 μg/ml の MIC を示した。また、患者由来のメチシリン耐性 *S. epidermidis*（MRSE）に対しても 1 μg/ml の MIC を示した。さらに、ストレプトグラミン系抗生物質グループ A に属するグリセオビリジンとの併用により、MRSE に対する相乗効果を示した。今回の結果から、エタマイシン A が MRSE に対して有効であることが明らかとなった。

Etamycin A, a cyclic depsipeptide belonging to group B of streptogramin antibiotic family, was identified as an antibacterial substance from the culture extract of the actinomycete AUMR0230 strain isolated from the soil in Semboku City, Akita Prefecture. The minimum inhibitory concentration (MIC) for the Gram-negative bacterium *Escherichia coli* was ≥128 μg/ml, while the MIC for the Gram-positive bacterium *Staphylococcus aureus* was 0.5 μg/ml. Etamycin A showed MIC of 1 μg/ml against *S. epidermidis* that is a universal indigenous bacterium but is often encountered in hospital infections. Etamycin A also showed MIC of 1 μg/ml for patient-derived methicillin-resistant *S. epidermidis* (MRSE). Furthermore, etamycin A showed a synergistic effect against MRSE in combination with griseoviridin, group A of streptogramin antibiotic family. These studies indicated that etamycin A is an effective streptogramin antibiotic against MRSE.

Etamycin, Streptogramin, Antibiotic

発表責任者：小泉幸央（ykoizumi@med.akita-u.ac.jp）

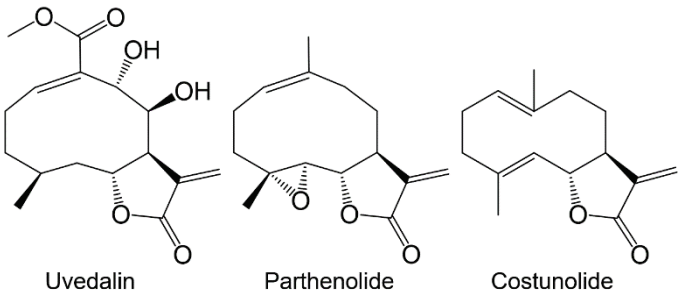
講演番号：4F04-09
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:30～ ミーティングルーム F

ヤーコン葉由来メランポライドの昆虫摂食阻害活性を向上させる化学構造因子

SAR study of melampolide from yacon as insect antifeedant

○和久田 悦生、森本 正則、行迫 海人、松田 一彦（近畿大農）
○Yoshiki WAKUDA, Masanori MORIMOTO, Kaito YUKISAKO, Kazuhiko MATSUDA (Kindai Univ.)

ヤーコン（*Smallanthus sonchifolius*）は、肥大した根茎を食用とするキク科の作物であり、病害虫抵抗性が高い。これまでに、本種葉部腺毛由来の Uvedalin と Enhydrin などのメランポライド類が、植食性昆虫からの食害抵抗因子の 1 つであり、それらのγ-ラクトン環上の末端メチレン基が高い昆虫摂食阻害活性発現に重要であることを報告している[1)]。本研究ではメランポライド類の昆虫摂食阻害活性に関する構造活性相関を深く理解するため、当該活性に対する本物質の基本骨格の役割を検討した。昆虫摂食阻害活性は、ハスモンヨトウ（*S. litura*）3 齢幼虫を用いた選択的リーフディスク試験で評価した。基本骨格の生物活性の寄与を検討するために構造類似のゲルマクレノライドについても同様に生物活性を評価した。メランポライド骨格をもつ Parthenolide とゲルマクレノライド骨格をもつ Costunolide の昆虫摂食阻害活性は同程度であった。さらに本研究では、置換基を部分的に除去したメランポライド加水分解物や Costunolide 誘導体の昆虫摂食阻害活性も評価したので併せて報告する。



1): Tsunaki, K.; Morimoto, M., Chemical defense of yacón (*Smallanthus sonchifolius*) leaves against phytophagous insects: Insect antifeedants from yacón leaf trichomes. *Plants* 2020, *9* (7), 848.

Yacón is a perennial crop with high insect resistance. Its leaves have many glandular trichomes, which may be related to pest resistance. The major constituents of the trichomes were identified as sesquiterpene lactones (SLs), uvedalin and enhydrin known as melampolides. Although these SLs exhibited remarkably strong insect antifeedant activity, reduced corresponding derivatives exhibited moderate insect antifeedant activity against *S. litura* larvae. The two backborn analogs, parthenolide (melampolides) and costunolide (germacrenolide) showed similarly moderate insect antifeedant activity. The results indicate that the substituent patterns of SLs may be related to the insect antifeedant activities. Further, partial hydrolysates of natural melanpolides were prepared and evaluated in this SAR study. With these results, SAR of the compounds will be discussed.

insect antifeedant, yacon, sesquiterpene lactone

講演番号：4F04-10
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:30～ ミーティングルーム F

インドネシア産プロポリスの起源植物に含まれる成分に関する化学的研究

New compounds from the plant origin of Indonesian propolis

○水野 さやか[1]、宮田 椋[1]、本田 沙理[1]、ムハマッド サーラン[2]、谷口 透[3]、熊澤 茂則[1] ([1]静県大食、[2]インドネシア大理工、[3]北大理学)
○Sayaka MIZUNO[1], Ryo MIYATA[1], Sari HONDA[1], Muhamad SAHLAN[2], Tohru TANIGUTI[3], Shigenori KUMAZAWA[1] ([1]University of Shizuoka, [2]Universitas Indonesia, [3]Hokkaido University)

【背景・目的】

プロポリスはミツバチが植物の新芽や樹脂状物質を巣内に蓄えたものであり、様々な生理活性を持つことが知られている。プロポリスの原料となる植物を起源植物といい、その違いによってプロポリスの含有成分や生理活性に多様性を生み出している。これまでの我々のインドネシア産プロポリスの研究過程において、プロポリスを採集した養蜂場でのミツバチの行動的観察により、本プロポリスの起源植物がカロフィラム(*Calophyllum*)属の植物樹脂であることが示唆された。そこで本研究ではインドネシア産プロポリスの起源植物の同定、およびその含有成分の解明を目的とした。

【方法・結果】

インドネシアのロンボク島にて採集したプロポリスおよびカロフィラム樹脂の 70%エタノール抽出物を LC-MS により分析し、その成分パターンを比較したところ、同一パターンを示した。このことから、本プロポリスの起源植物をカロフィラムが分泌する樹脂と同定した。またプロポリスおよびカロフィラムの含有成分を明らかにするため、カロフィラム樹脂の 70%エタノール抽出物の成分分析を行った。成分分析の結果、新規クロマノン類縁体を単離・同定した。現在は本化合物の立体構造の決定および生理活性評価を進めている。

Propolis is a natural resinous substance collected from the buds and exudates of certain tree and plants by honeybees. The chemical components of propolis depend on the vegetation at the collection site, since honeybees collect resins from target plants grown near beehives as source of propolis. We investigated the plant origin of propolis collected on Indonesia.

By observing bee behavior, we confirmed that honeybee in Indonesia collected the resin of *Calophyllum* spp. Thus, it is suggested that the plant origin of this propolis is the resin of *Calophyllum* spp. In order to determine the plant origin of the propolis, we performed LC-MS analysis of the ethanol extracts of propolis and *Calophyllum* resin. Because both chromatograms showed the simillar pattern, we determined that the plant origin of this propolis is the resin of *Calophyllum* spp. We also conducted the component analysis of *Calophyllum* resin and isolated new chromanone derivatives.

Propolis, Calophyllum, Chromanone

発表責任者：熊澤茂則（kumazawa@u-shizuoka-ken.ac.jp）

講演番号：4F04-11
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:30～ ミーティングルーム F

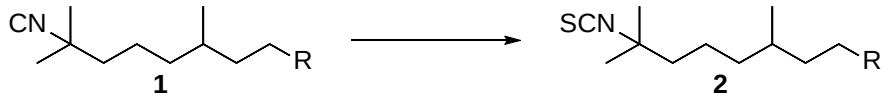
β-シトロネロール誘導体イソチオシアナート化合物の合成とフジツボキプリス幼生に対する付着阻害活性の評価

Anti-barnacle activity of isothiocyanates derived from *β*-citronellol

○藤原 隆也[1]、中嶋 菜摘[1]、野方 靖行[2]、吉村 えり奈[3]、千葉 一裕[1]、北野 克和[1] ([1]東農工大農、[2]電中研、[3]株式会社セレス)
○ Takaya FUJIHARA[1], Natsumi NAKAJIMA[1], Yasuyuki NOGATA[2], Erina YOSHIMURA[3], Kazuhiro CHIBA[1], Yoshikazu KITANO[1] ([1]Tokyo Univ. of Agriculture and Tech., [2]CRIEIPI, [3]CERES Co. Ltd.)

【目的】フジツボなどの付着生物は船底、漁網、発電所の冷却システムに付着し多大な被害を与えている。これらの被害に対して、亜酸化銅などが付着防汚剤として用いられ、付着生物の付着を防汚している。しかしながら、現在使用されている防汚剤は環境への負荷が懸念されており“環境に優しい”付着防汚剤の開発が求められている。これまでに我々は、ウミウシなどから単離されるイソシアノ基（-NC）を有する天然物をリード化合物とした、付着阻害活性に関する構造－活性相関の考察を行ってきた。[1)] その結果、イソシアノ基が付着阻害活性発現に重要であることを明らかにするとともに新たな付着阻害物質を創製してきた。一方で、付着阻害活性を有する天然物として、イソチオシアナート基（-NCS）を有する化合物も報告されているが、詳細な構造－活性相関の考察はまだ行われていない。そこで本研究では、低毒性で強い付着阻害活性を持つ化合物の探索として*β*-シトロネロールを出発物質としたイソチオシアナート化合物の合成と構造活性相関の考察を行った。

【方法と結果】*β*-シトロネロール誘導体イソニトリル化合物（**1**）[2)]より目的とするイソチオシアナート化合物（**2**）を合成し、得られた化合物についてフジツボキプリス幼生を用いた実験室内における付着試験を行った。その結果、有効な付着阻害活性を示す化合物が確認された。特に、窒素を含んだ官能基において低毒性で有効な付着阻害活性（安全域；$LC_{50}/EC_{50} > 100$）が示された。これらのことからイソチオシアナート化合物が環境に優しい付着阻害剤の一つとなり得ることが示唆された。



Fifteen isothiocyanates derived from *β*-citronellol was synthesized and antifouling activity against cypris larvae of the barnacle *B. amphitrite* was evaluated. The synthesized isothiocyanate showed potent anti-fouling activity without significant toxicity. In particular, compounds which have nitrogen-containing functional groups exhibited promising activity. The results indicated that the prepared isothiocyanates should be useful for further research focused on the development of environmentally friendly antifouling agents.

1) Kitano, Y. *化学と生物*, **2019**, 352. 2) Kitano, Y. *et al.*, *biofouling*, **2011**, 201.

antifouling activity, isothiocyanate, structure-activity relationships

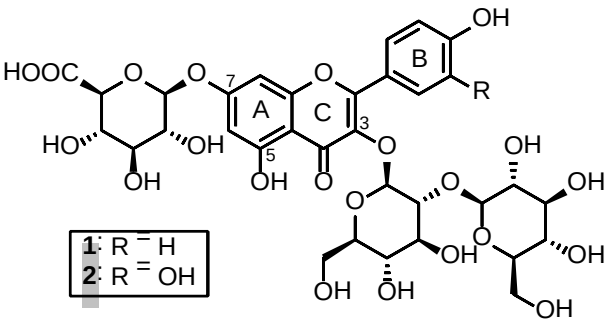
講演番号：4F04-12
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:30～ ミーティングルーム F

タマネギに含まれる蛍光性フラボノイド配糖体の合成研究

Synthetic study of fluorescent flavonoid glycosides isolated from *Allium cepa*

○西條 祐輝、堀 優希、二瓶 賢一（宇都宮大農）
○Yuki NISHIJO, Yuki HORI, Ken-ichi NIHEI (Utsunomiya Univ.)

タマネギ(*Alliumu cepa*)の萌芽から単離された **1** と **2** は，蛍光性を持つ天然フラボノイド配糖体である．それらの構造には，グルクロン酸およびソフォロースが含まれ，高い新奇性を有する．しかしながら，現在まで **1** と **2** の合成研究は行われていない．本研究では，化学的反応と酵素的反応を組み合わせ，**1** および **2** の全合成を行うことを計画した．



出発物である 2,4,6-トリヒドロキシアセトフェノンをメトキシメチル基で保護し，アルドール縮合によってカルコンを得た(71%)．このカルコンから，エポキシドを経由し，メトキシメチル基の除去, エポキシ環の開環および環状エーテル化から成る一連の改良 Algar-Flynn-小山田反応により，フラバノノールを合成した(77%)．さらにその C 環部を酸化して，フラボノールに導いた(90%)．一方，メチル-4,6-*O*-ベンジリデン-α-D-グルコピラノシドから，Koenigs-Knorr 反応とアセトリシスによって，ソフォロース供与体を合成した(28%)．現在，フラボノールに対する選択的グリコシル化を種々検討している．

Fluorescent flavonoid glycosides **1** and **2** were found in the buds of *Alliumu cepa*. They are structurally unique natural products because of the presence of glucuronic acid and sophorose parts. However, their synthetic studies have not been investigated so far. Thus, we envisioned the total synthesis of **1** and **2** in combination with chemical and enzymatic transformations.

Methoxymethylation of 2,4,6-trihydroxyacetophenone as a starting substance, followed by aldol condensation gave a chalcone in 71% yield. A flavanonol was synthesized in 77% yield via a modified Algar-Flynn-Oyamada reaction including epoxidation, the removal of methoxymethyl groups, ring-opening reaction, and cyclic etherification. Subsequently, a flavonol was obtained in 90% yield by the oxidation of the C-ring. On the other hand, methyl-4,6-*O*-benzylidene-α-D-glucopyranoside was converted to a sophorose donor thorough a Koenigs-Knorr glycosylation and acetolysis (28% yield). Selective glycosylation on the flavonol skeleton has been planned under several conditions.

flavonoid glycoside, fluorescent natural products, synthetic study

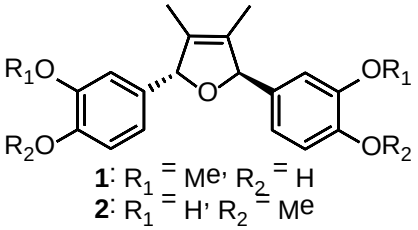
発表責任者：西條祐輝（mc206663@cc.utsunomiya-u.ac.jp）

講演番号：4F04-13
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:30～ ミーティングルーム F

対称ジヒドロフランリグナン，リベシン B の全合成と構造訂正

Total synthesis and structural revision of ribesin B, a symmetric dihydrofuran lignan

○堀尾 嘉恵、二瓶 賢一 (宇都宮大農)
○Kae HORIO, Ken-ichi NIHEI (Utsunomiya Univ.)



1: R_1 = Me, R_2 = H
2: R_1 = H, R_2 = Me

リベシン B (**1**)は，カシス(*Ribes nigrum*)の葉から単離された対称ジヒドロフランリグナンである．本研究では，連続的 Michael 付加−環化を鍵段階として **1** の全合成を行った．また，天然物の真の構造は，イソバニリン誘導体 **2** であることを明らかにした．

バニリンを出発物として，Grignard 反応および Knoevenagel 縮合を行うことにより，プロパルギルアルコール部分とエノン部分を合成した．それらを連続的ヘテロ Michael 付加−環化により連結し，非対称テトラヒドロフランに導いた．その加水分解，メチル化およびヒドリド還元で，非対称ジヒドロフランを得た．次に水酸基をトシル化し，ヒドリド還元を行うことで，対称ジヒドロフランを合成した．最後に，そのベンジル基を除去して **1** を得た(総収率 2%)．

天然物 **1** と合成した **1** の ^{13}C NMR データには，少しの差異が観察された．そこで，出発物としてイソバニリンを用い，同様の経路で **2** を化学合成した(総収率 7%)．この ^{13}C NMR データは天然物 **1** とよく一致し，天然物の真の構造は **2** であるとの結論に達した．

Ribesin B (**1**) is a symmetric dihydrofuran lignan isolated from the leaves of *Ribes nigrum*. In this study, we demonstrated the total synthesis of **1** via a sequential Michael addition-carbocyclization. As a result, the structure of the natural product was revised to isovanillin derivative **2**.

A starting material, vanillin, was transformed into a propargyl alcohol part and an enone part through a Grignard reaction or a Knoevenagel condensation. Both parts were connected by the sequential Michael addition-carbocyclization to obtain an asymmetric tetrahydrofuran. A symmetric dihydrofuran was synthesized by tosylation and hydride reduction of the tetrahydrofuran and, finally, **1** was afforded by the cleavage of all the protective groups (2% of total yield).

The ^{13}C NMR data of synthetic product **1** were slightly different from those of natural product **1**. Hence, **2** was synthesized from isovanillin as a starting material based on the similar route of **1** (total yield 7%). The ^{13}C NMR data of synthetic product **2** were highly consistent with those of natural product **1**, indicating that the structure of the natural product should be **2**.

dihydrofuran lignan, sequential Michael addition-carbocyclization, symmetric natural products

発表責任者：堀尾嘉恵（mc206666@cc.utsunomiya-u.ac.jp）

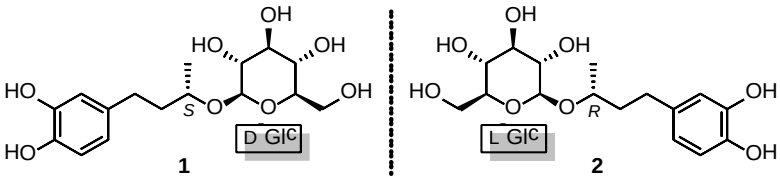
講演番号：4F04-14
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:30～ ミーティングルーム F

ポリフェノール配糖体，ソンネルフェノリック C の化学合成と構造訂正

Chemical synthesis and structural revision of a polyphenol glycoside, sonnerphenolic C

○島影 凌、岩舘 丈央、二瓶 賢一（宇都宮大農）
○Ryo SHIMAKAGE, Takehiro IWADATE, Ken-ichi NIHEI (Utsunomiya Univ.)

ソンネルフェノリック C (**1**)は，メグスリノキ(*Acer nikoense*)などに含まれる天然配糖体である．当研究室では以前，**1** を全合成し，その高いラジカル消去活性を明らかにした．しかしながら，合成品 **1** と天然物 **1** の旋光度の符号は，逆であった[合成品: -15.5 (c 1.8，25 °C)，天然物: +33.4 (c 1.8，27 °C)]．そこで，天然物の真の構造を明らかにするために，**1** のエナンチオマーであるL-グルコシド **2** を化学合成し，NMR スペクトルと旋光度の比較を行った．



市販の 2,4-ジヒドロキシベンズアルデヒドをベンジル基で保護し，アルドール縮合とヒドリド還元により，アグリコンを得た(収率 57%，3 段階)．Koenigs-Knorr グリコシル化で L-グルコースユニットを導入した後，糖部分をベンジリデンアセタール化し，エピマーを分離した(収率 26%，3 段階)．最後にアセタールおよびベンジル基を除去し，**2** の化学合成を達成した(総収率 10%，7 段階)．その比旋光度は+18.5 (c 1.8，25 °C)を示し，かつ NMR データは天然物のものと一致した．したがって，ソンネルフェノリック C の真の構造は，L-グルコシド **2** であると決定した．

Sonnerphenolic C (**1**) is a natural glycoside isolated from several plants including *Acer nikoense*. The total synthesis of **1** was accomplished and its antioxidant activity was clarified in our previous study. However, the specific rotation [-15.5 (c 1.8, 25 °C)] of synthetic product **1** was different from that [+33.4 (c 1.8, 27 °C)] of natural product **1**. Thus, L-glucoside **2**, the enantiomer of **1**, was chemically synthesized and comparisons of their NMR spectra and specific rotations were made to determine the structure of the natural product.

The aglycone part was synthesized from 2,4-dihydroxybenzaldehyde by benzylation, aldol condensation, and hydride reduction (57% yield via 3 steps). After introducing the L-glucose unit by a Koenigs-Knorr glycosylation, a single isomer of the glucoside was obtained by the benzylidene acetal derivatization (26% yield via 3 steps). Finally, by the removal of the acetal and benzyl groups, the chemical synthesis of **2** was achieved in 10% of total yield via 7 steps. The specific rotation [+18.5 (c 1.8, 25 °C)] and NMR assignments of **2** were consistent with those of the natural product. Consequently, the structure of sonnerphenolic C should be revised to **2**.

chemical synthesis, structural revision, polyphenol glycoside

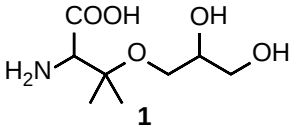
発表責任者：島影凌（mc196659@cc.utsunomiya-u.ac.jp）

講演番号：4F04-15
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:30～ ミーティングルーム F

スギヒラタケから単離された異常アミノ酸誘導体の全合成とその立体化学
Total synthesis and stereochemical investigation of an amino acid derivative isolated from *Pleurocybella porrigens*

○モウ ウェン ジ[1]、鈴木 智大[2]、河岸 洋和[3]、二瓶 賢一[1]([1]宇都宮大農、[2]宇都宮大バイオ、[3]静岡大農)
○Wen Tze MOW[1], Tomohiro SUZUKI[2], Hirokazu KAWAGISHI[3], Ken-ichi NIHEI[1] ([1]Utsunomiya Univ., [2]C-Bio, Utsunomiya Univ., [3]Shizuoka Univ.)

2009 年，スギヒラタケ(*Pleurocybella porrigens*)からアミノ酸誘導体 **1** が単離・構造された．本研究ではその絶対配置の決定を目的に，D-セリンメチルエステルを出発物質として **1** の全合成を行った．



1

グリニャール反応により，D-セリン誘導体にジメチル基を導入し，TEMPO 酸化を行うことで，L-ヒドロキシバリン誘導体を得た(収率 88%，3 段階)．この誘導体をベンジルエーテル化し，パラジウム触媒を用いた脱炭酸型*O*-アリル化により，アリルエーテルへと誘導した(収率 36%，2 段階)．次に，オスミウム酸化によりグリセロール誘導体をエピマー混合物として得た(収率 86%)．この混合物を順相 HPLC により分割し，加水素分解によりすべての保護基を除去して，**1** のエピマーをそれぞれ化学合成した(総収率 27%，7 段階)．天然物 **1** との ^{13}C NMR スペクトルおよび旋光度の比較により，**1** のアミノ酸側のキラル中心の絶対配置は，*S* であることが明らかになった．現在，改良モッシャー法を用いて，グリセロール側の絶対配置の決定を行っている．

A unique amino acid derivative **1** was isolated from the mushroom, *Pleurocybella porrigens*, in 2009 and its planar structure was determined by NMR analysis. In this study, we demonstrated the total synthesis of **1** started from D-serine methyl ester to determine its absolute configuration.

A L-hydroxyvaline intermediate was synthesized by the introduction of *gem*-dimethyl group on the D-serine ester using a Grignard reagent, followed by TEMPO oxidation (88% yield via 3 steps). After the derivatization of the intermediate into a benzyl ester, its decarboxylative *O*-allylation was performed in the presence of palladium catalyst to give an allyl ether (36% yield via 2 steps). The ether was transformed into an epimeric mixture of glycerol derivatives through osmium oxidation (86% yield). Each epimer was separated by using normal-phase HPLC and, finally, the removal of all the protective groups in the single isomer by hydrogenolysis afforded **1**. Thus, chemical synthesis of **1** was accomplished via 7 steps in 27% of total yield. The *S*-configuration of the chiral center of the amino acid part of **1** was determined by the inspection of NMR spectra and specific rotations. The determination of absolute configuration in the side of the glycerol part has been studied by the modified Mosher's method.

stereochemical investigation, amino acid derivative, *Pleurocybella porrigens*

発表責任者：Mow Wen Tze（mc196665@cc.utsunomiya-u.ac.jp）

講演番号：4F04-16
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:30～ ミーティングルーム F

スチリルクマリン類の合成及び構造活性相関に関する研究

Synthesis of styrylcoumarins and their structure activity relationship

○増本 壮一郎[1]、川井 悟[1]、常盤野 哲生[2]、吉澤 結子[2] ([1]東京電機大学、[2]秋田県立大学)
○Souichirou MASUMOTO[1], Satoru KAWAI[1], Tetuo TOKIWANO[2], yoshiko YOSHIZAWA[2] ([1]Tokyo denki Univ., [2]Akita prefectural Univ.)

【目的】従来の創薬研究では、分子内に生理活性発現部位を一つだけ持つ天然資源由来化合物をリード化合物として精力的な研究が行われた結果、新規構造の枯渇が問題化している。そこでこれまで明らかにされている生理活性発現部位を複数組み合わせた複合分子を合成し、新たな生物活性の発現や活性増強を探索する研究に注目が集まっている。本研究では、抗菌活性、抗腫瘍活性、細胞増殖抑制活性などの多様な生物活性を示すクマリン骨格とがん抑制効果が報告されているスチルベン骨格の両骨格を有する複合分子について検討することとした。

これまでに当研究室では、スチルベン骨格のベンゼン環と二重結合部分をクマリン骨格に内包させた 3-フェニルクマリン類とスチルベン骨格のベンゼン環のみをクマリン骨格に内包させた 6-および 7-スチリルクマリン類の合成を行い、複合分子化により生物活性が増強することを報告している(2018 年度日本農芸化学会大会 講演番号 2A16a07)。

本研究では複合分子化により、活性増強が認められた 6-および 7-スチリルクマリンに種々の官能基を導入した化合物の合成を検討した。

【方法】サリチルアルデヒド類とオルト酢酸トリメチルとの Perkin 反応により、6-または 7-メチルクマリンを合成し、そのメチル基を Wohl-Ziegler 反応により臭素化した後、PPh_3 と反応させてホスホニウム塩とし、ベンズアルデヒド類と Wittig 反応させて、6-, 7-スチリルクマリン類を合成した。また、フェノール類とアセト酢酸エチルとの Pechmann 反応により 4-メチルクマリン類を合成し、４位メチル基の臭素化およびホスホニウム塩化の後 Wittig 反応により 4-スチリルクマリン類の合成を検討した。

【結果】本研究ではスチリルクマリン類における置換基の電気的効果が生物活性に及ぼす影響を検討するため、ハロゲン基を導入したチリルクマリン類の中心に合成を行った。これらの生物活性については、現在検討中である。またラクトン環へのスチリル基導入も検討している。

We have previously synthesized 3-phenylcoumarins and 6- and 7-styrylcoumarins as a hybrid molecule between coumarin and stilbene. Among them, 6-and 7-stylylcoumarin demonstrated the enhanced biological activity. In order to study the electronic effects of substituents on the biological activity, we synthesized various halogenated 6- and 7-styrylcoumarins, and their biological activities are currently under investigation. We are also attempting to synthesize 4-styrylcoumarins.

coumarin, stilbenoid, hybrid compound

発表責任者：増本壮一郎（17rb067@ms.dendai.ac.jp）

講演番号：4F04-17
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:30～ ミーティングルーム F

ジベンゾイルメタンの合成と生物活性について

Synthesis of dibenzoylmethanes and their biological activity

○中間 都海[1]、川井 悟[1]、常盤野 哲生[2]、吉澤 結子[2] ([1]東京電機大学、[2]秋田県立大学)
○Tsunami NAKAMA[1], Satoru KAWAI[1], Tetsuo TOKIWANO[2], Yoshiko YOSIZAWA[2] ([1]Tokyo denki Univ., [2]Akita prefectural Univ.)

【目的】マメ科植物クロヨナ（*Millettia pinnata*）種子から抽出されるカランジャオイルには紫外線吸収作用や抗炎症作用があり、化粧品成分や害虫忌避剤として用いられている。カランジャオイルには 1,3-ジケトン誘導体であるポンガモールが含有されていることが報告されており、その生物活性に興味がもたれている。ポンガモールには、骨格筋細胞表面に存在している GLUT4 によって血中グルコースの取込みを亢進する作用や血糖低下作用なども報告されている。1,3-ジケトン類には、2 つのケト基に挟まれた活性メチレンが存在することから、高い反応性を示し、これにより強い生物活性を示すことが期待されている。しかしながら、ポンガモールのようなジベンゾイルメタン類はその反応性の高さから容易に環化しフラボン骨格等に変換するため、天然資源中に存在するジベンゾイルメタン類の種類は少なく、構造活性相関に関する研究はほとんど行われていない。

そこで本研究では、ジベンゾイルメタン類の系統的合成を試み、合成した化合物の生物活性を調べることで、構造活性相関に関する知見を深めることを目的とした。主にジベンゾイルメタンの 2 つのベンゼン環に種々の官能基を導入した化合物の合成を検討するとともに、ポンガモール関連化合物の合成についても検討を行うこととした。

【方法】本研究では、アセトフェノン類と安息香酸類の Claisen 縮合によりジベンゾイルメタン類の合成を行った。具体的には、アセトフェノン類をトルエン溶媒中水素化ナトリウム存在下で安息香酸エステル類と 24 時間加熱還流して、ジベンゾイルメタン類を合成した。これらはシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製した。

【結果】アセトフェノン類と安息香酸類の組み合わせにより種々の置換基を導入したジベンゾイルメタン類を合成した。また、フラン環やピラン環を導入したジベンゾイルメタン類の合成についても検討するとともに、これらの生物活性についても報告する予定である。

Pongamol is a 1,3-dikotone-containing natural product, isolated from Karanja oil *Millettia pinnata* seeds that were used as a cosmetic ingredient and as an insect repellent. Because the structural variety of dibenzoylmethane in nature seemed to be limited, chemical synthesis is required to drive efforts focused on evaluating their potential value as medicines. The synthesis and the biological activity of dibenzoylmethane will be presented.

dibenzoylmethane, pongamol, claisen condensation

発表責任者：中間都海（17rb053@ms.dendai.ac.jp）

講演番号：4G01-01
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:00～ ミーティングルーム G

ポリシアル酸転移酵素 ST8SIA2 と ST8SIA4 が合成するポリシアル酸の構造と性質

Different Properties of Polysialic Acids Synthesized by Either or Both of the Polysialyltransferases ST8SIA2/STX and ST8SIA4/PST

○森 愛理[1,2,3]、羽根 正弥[1,2,3]、北島 健[1,2,3]、佐藤 ちひろ[1,2,3] ([1]名大院・生命農学、[2]名大・生物機能セ、[3]iGCORE)
○Airi MORI[1,2,3], Masaya HANE[1,2,3], Ken KITAJIMA[1,2,3], Chihiro SATO[1,2,3] ([1]Grad. Sch. Bioagr. Sci., Nagoya Univ., [2]Biosci. Biotech. Center, Nagoya Univ., [3]iGCORE)

神経細胞接着分子(NCAM)は神経細胞の表面に局在し、脳においてポリシアル酸(polySia)の主要な担体タンパク質である。脳内で polySia-NCAM は、多数の負電荷と巨大な排除体積によって細胞間相互作用を負に制御する反接着機能を持ち、神経の可塑性や正常な神経回路の形成や神経発生を可能にしている。また、当研究室では新たに分子保持機能を見出し、NCAM 上の polySia が神経機能に深く関わる生理活性因子と直接結合し、その濃度や受容体への提示を制御することを明らかにしてきた。NCAM 上の polySia 構造は、ポリシアル酸転移酵素(polyST)，STX/ST8SIA2 と PST/ST8SIA4 によって制御される。STX-欠損(KO)マウスと PST-KO マウスは polySia の量、海馬の形態など様々な表現型が異なるが、そのメカニズムは不明である。また、近年、polySia と統合失調症、自閉症、双極性障害といった精神疾患の関連が報告されている。統合失調症患者に見出された STX(SNP-7)(g421a, E141K)は酵素活性が顕著に減少し、それが合成する polySia 構造の分子保持機能が弱まることを当研究室で明らかにしてきた。以上のことから、我々は polySia-NCAM の質と量の厳密な制御が正常な脳機能に必要であり、その制御は STX と PST が生合成した polySia 構造が持つ性質の違いに起因すると考えている。本研究ではこの仮説を検証するため、次の実験を行った。はじめに STX, STX(SNP-7), PST によって生合成された polySia-NCAM を精製し、それらの構造について免疫学的及び化学的解析を行った。しかし従来の方法では、STX と PST が生合成する polySia 構造の違いは観察されなかった。次に polySia-NCAM が持つ分子保持機能と反接着機能を分子間相互作用解析測定法によって評価したところ、STX が生合成する polySia 鎖は反接着機能と分子保持機能を同時に獲得している一方で、PST が生合成する polySia 鎖は分子保持機能のみ獲得していることが明らかとなった。よって、従来の解析方法では明らかにできない polySia-NCAM の質の違いを、初めて明らかにすることができた[Mori A. *et al*. (2017) *Glycobiology* 27:834-846]。STX(SNP-7)が生合成した polySia-NCAM は構造の劣化が見られ、機能の低下が示された。以上の結果は、これまで不明であった polyST-KO マウスの表現型の違いや精神疾患の原因の手がかりになる可能性がある。

Polysialic acid (polySia) occurs mainly on the neural cell adhesion molecule (NCAM). PolySia is synthesized by two polysialyltransferases (polySTs), ST8SIA2/STX and/or ST8SIA4/PST. Our objective is to elucidate the quality of polySia-NCAM derived from each polySTs and to analyze the relationship between the quality and the function of each polySia-NCAM. As a result, the properties of polySia-NCAM were highly regulated by polySTs.

polySia, SPR, schizophrenia

発表責任者：森　愛理（mori.airi@d.mbox.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：4G01-02
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:00～ ミーティングルーム G

サナギタケ由来レクチン（CmLec4）の諸性質決定とその結合タンパク質の糖鎖解析

Characterization of lectin (CmLec4) from *Cordyceps militaris* and glycan analysis of CmLec4-binding substrates

○小野 晶子[1]、佐藤 千裕[1]、鈴木 稔之[1]、崔 宰熏[2,3]、尾形 慎[4]、平井 浩文[3]、道羅 英夫[3]、河岸 洋和[2,3]、鈴木 智大[1] ([1]宇都宮大・バイオ、[2]静岡大・農、[3]静岡大・グリーン研、[4]福島大・農)
○ Akiko ONO[1], Chihiro SATO[1], Toshiyuki SUZUKI[1], Jae-hoon CHOI[2,3], Makoto OGATA[4], Hirofumi HIRAI[3], Hideo DOHRA[3], Hirokazu KAWAGISHI[2,3], Tomohiro SUZUKI[1] ([1]C-Bio, Utsunomiya Univ., [2]Dept. of Agr., Grad. Sch. of Integr. Sci. and Technol., Shizuoka Univ., [3]Res. Inst. of Green Sci. and Technol., Shizuoka Univ., [4]Fac. of Food and Agric. Sci., Fukushima Univ.)

本研究室ではこれまでに *Cordyceps* 属の一種であるサナギタケ（*Cordyceps militaris*）のレクチンタンパク質が、菌と昆虫との相互作用に関与しているのではないかという仮説のもと、新規のサナギタケ由来レクチン（*C. militaris* lectin 4、CmLec4）を精製・諸性質を決定し、宿主であるカイコ蛹中の性特異的貯蔵タンパク質（Sex-specific storage-protein 2、SP2）に結合することを見出した。さらに酵母 *Kluyveromyces lactis* を用いて CmLec4 の異種発現に成功し、recombinant CmLec4（rCmLec4）を接種したカイコ蛹では有意に羽化が抑制されることを明らかにしている [1)]。

そこでサナギタケ由来レクチンの生体内の機能の推定を目的として、1) rCmLec4 を用いてより広範な糖結合特異性を明らかにすること、2) カイコ蛹中の標的タンパク質 SP2 の糖鎖構造解析を行った。rCmLec4 の赤血球凝集反応阻害試験および Biacore の結果より、単糖およびオリゴ糖ではキチンオリゴ糖、糖タンパク質では特に *N* 型糖鎖を主に持つ asialo-fetuin を認識した。さらにカイコ蛹由来 SP2 タンパク質を PNGase F 処理によって *N* 型糖鎖を切り出し、精製後、ラベル体を付加した。MALDI-TOF/MS 解析を用いて *N* 結合型糖鎖の構造推定を行い、いくつかの糖鎖構造を予測した。

In our previous study, we succeeded in purification and characterization of a novel lectin (*Cordyceps militaris* lectin: CmLec4) from the mushroom *C. militaris* and found that CmLec4 binds to the sex-specific storage protein (SP2) in silkworm extract of *Bombyx mori*. Furthermore, we successfully expressed recombinant CmLec4 (rCmLec4) using yeast *Kluyveromyces lactis*, and revealed that silkworm pupa inoculated with rCmLec4 significantly suppress its emergence compared to the control[1)].

Thus, we performed more detailed analysis to estimate the function of CmLec4 *in vivo*: 1) evaluation of sugar-binding specificity of CmLec4 using hemagglutination inhibition assay and Biacore analysis, 2) glycan analysis of CmLec4-binding substrates (SP2). As results of hemagglutination inhibition assay and Biacore analysis, rCmLec4 showed strong affinity to chitin oligosaccharides and asialo-fetuin among saccharides and glycoproteins tested. Furthermore, we confirmed that the SP2 protein possessed *N*-linked oligosaccharides and succeeded in predicting some oligosaccharide structures of SP2 from the results of glycan analysis.

1) 小野ら、冬虫夏草（*Cordyceps militaris*）由来レクチンの機能解析、日本農芸化学会 2019 年度大会

lectin, sugar-binding specificity, fungus

講演番号：4G01-03
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:00～ ミーティングルーム G

グリコマクロペプチドを介したビフィズス菌間のクロスフィーディング効果

Glycomacropeptide based cross-feeding activities between Bifidobacteria under in vitro conditions

○両角 麻衣、和田 泰明、江原 達弥、和泉 裕久、中村 浩彦、宮地 一裕（森永乳業株式会社　健康栄養科学研究所）
○MAI MOROZUMI, YASUAKI WADA, TATSUYA EHARA, HIROHISA IZUMI, HIROHIKO NAKAMURA, KAZUHIRO MIYAJI (MORINAGA MILK INDUSTRY CO., LTD. Wellness & Nutrition Science Institute)

人工栄養児の腸内細菌叢は母乳栄養児と比較して、腸内細菌叢に占めるビフィズス菌の割合が少ない。ビフィズス菌は様々な生理作用を通じて乳児の健康や発達に寄与していることから、人工栄養児でビフィズス菌を増やす意義は大きい。母乳はヒトミルクオリゴ糖　(HMO)、糖ペプチドなどの多様なビフィズス菌増殖因子を含んでおり、ビフィズス菌優位な菌叢形成に寄与していることが知られている。本研究では、牛乳由来の糖ペプチドであるグリコマクロペプチド (GMP) に注目し、ビフィズス菌増殖促進効果を検証した。まず、GMP を唯一の糖源とした培地に *Bifidobacterium bifidum* (*B. bifidum*)、*B. breve*、*B. infantis*、*B. lactis*、および *B. longum* を接種し、それぞれの菌種に対する増殖促進効果を評価した。次に、糖鎖を化学的に切断した GMP を用いて *B. bifidum* を培養し、*B. bifidum* 増殖促進効果における GMP 糖鎖の関与を検証した。さらに、GMP を唯一の糖源とする培地で *B. bifidum* を培養した後、その培養上清を用いて *B. breve*、*B. infantis*、*B. lactis*、および *B. longum* を培養して、「クロスフィーディング効果」の有無を評価した。GMP によるビフィズス菌増殖効果は *B. bifidum* に対してのみ確認された。GMP 糖鎖を切断した場合に増殖効果が消失したことから、その効果は GMP 糖鎖に由来するものと考えられた。また GMP を含む培地で *B. bifidum* を培養して得られる培養上清は *B. breve*、*B. infantis* に対して増殖促進効果を発揮したことから、GMP はビフィズス菌種間でクロスフィーディング効果を発揮すると考えられた。以上の結果から、GMP にはその糖鎖を介した HMO と類似のビフィズス菌増殖作用があることが示され、GMP による人工栄養児の腸内細菌叢改善効果が期待された。

Bifidobacteria are considered beneficial to infant health, whereas bifidobacteria are less prevalent in formula-fed infants compared with breast-fed infants. Breast milk contains bifidogenic factors such as human milk oligosaccharide (HMO) and glycopeptides, and they would contribute to enriching bifidobacteria in the microbiota of breast-fed infants. This study investigated the bifidogenic effects of cow's glycomacropeptide (GMP). *Bifidobacterium bifidum* (*B. bifidum*) was grown in the GMP-containing media, while it was not observed in *B. breve*, *B. infantis*, *B. lactis,* and *B. longum*. The growth of *B. bifidum* was abolished when glycans in GMP was chemically cleaved, indicating the involvement of the glycans in the growth of *B. bifidum*, *B. breve* and *B. infantis* were grown in the spent media of *B. bifidum*, indicating the "cross-feeding" of GMP on bifidobacteria species. Collectively, glycans in GMP would have bifidogenic effects similar to HMO, which would contribute to the development of healthy microbiota in infants.

Glycomacropeptide, Cross-feeding, Bifidobacterium

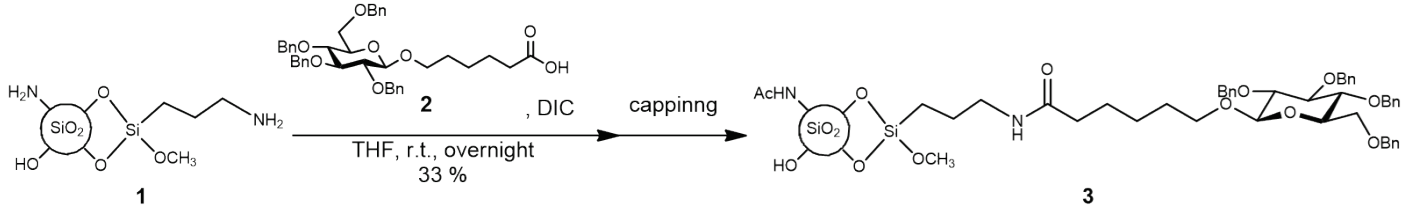
講演番号：4G01-04
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:00～ ミーティングルーム G

糖修飾シリカゲルを用いた分子センシングに関する研究

Investigation of molecular sensing by using surface modified silica gel with carbohydrates

○内田 司[1]、中村 彩乃[2]、蟹江 善美[3]、蟹江 治[1,2] ([1]東海大　院工、[2]東海大　工、[3]東海大　技)
○Tsukasa UCHIDA[1], Ayano NAKAMURA[2], Yoshimi KANIE[3], Osamu KANIE[1,2] ([1]Tokai Univ. Grad. Sch., [2]Tokai Univ. Eng., [3]Tokai Univ. Res. Prom. Dev.)

人類の生存域拡大には未知物質や未知病原体との遭遇が必然であり、安全を保証するためにはセンシング技術開発が必要である。インフルエンザ等のウイルスは細胞表面のシアル酸を含む糖鎖を選択的に認識しているが、このような生体内の分子認識機構を汎用的に応用できれば、次世代のセンシングツールと成り得る。このような分子認識は、様々な官能基間での相互作用の総体ということができる。糖は立体配置が確定した複数の水酸基を有しており、化学的に容易に保護基の導入が可能で、検出対象とする官能基分子群に合わせた立体や官能基を選択することができる。一方、多孔性のシリカゲル表面のシラノール基は様々に化学修飾が可能である。本研究ではシリカゲル表面にセンシング素子として、糖骨格を有する分子を用いたセンシングツールの創成とその利用を目指し、ラマン顕微鏡を用いて物質の吸着特性を観察することで、糖誘導体修飾シリカゲルの有用性を検討した。



As human beings continue to gain their area of living, encountering unknown substances, viruses, and bacteria is imminent. The development of sensing technology is needed to guarantee our sustainable development. Influenza virus as an example selectively recognizes sialoside on the host cell surface through inter molecular recognition. Such a recognition can be divided into various elemental interactions. We envisioned that fundamental mechanism of biological interaction can be adopted into and applied to artificial sensor elements. Carbohydrates hold multiple hydroxyl groups attached to chiral centers that can be chemically protected. On the other hand, porous silica gel can be surface modified by many compounds. In this study, we aimed to develop a new sensing tool that utilize sugar skeleton as a sensing element at the surface of silica gel, whose properties are examined by confocal Raman microscope.

carbohydrates, silica gel, Raman microscope

講演番号：4G01-05
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:00～ ミーティングルーム G

多分岐糖鎖をもつ抗体の調製と機能解析

Preparation and biological activities of antibodies with multi-branched complex-type *N*-glycans

○高島 晶、黒河内 政樹、月村 亘、森 昌子、大隈 賢二、菅原 州一、天野 純子、水野 真盛、高田 美生、松田 昭生（（公財）野口研）
○Shou Takashima, Masaki Kurogochi, Wataru Tsukimura, Masako Mori, Kenji Osumi, Shu-ichi Sugawara, Junko Amano, Mamoru Mizuno, Yoshio Takada, Akio Matsuda (The Noguchi Inst.)

健常人の抗体には、おもに様々な構造をした 2 本鎖複合型糖鎖がそれぞれ一定の割合をもって結合しており、3 本鎖や 4 本鎖の複合型糖鎖が結合した抗体はほとんど存在していない。このメカニズムの詳細はまだ明らかにされていないが、近年、糖鎖リモデリング技術を用いて、人為的に 3 本鎖糖鎖をもつ抗体が調製されている。このような分岐型糖鎖をもつ抗体の諸性質についてはまだ不明な点が多いことから、本研究ではその調製と機能解析について検討することにした。

まず出発材料として、2 本鎖複合型糖鎖である G0 型糖鎖のオキサゾリンと EndoS 変異体（グライコシンターゼ）を用いて、G0 型糖鎖が結合した抗体（トラスツズマブ）を調製した。これに対して分岐構造を導入する各種の *N*-アセチルグルコサミン転移酵素や、ガラクトース転移酵素、シアル酸転移酵素などの糖転移酵素を連続的に作用させていったところ、抗体上に bisecting GlcNAc 構造を含むシアル酸含有 5 本鎖糖鎖を形成することができた。また機能解析用に、3 本鎖および 4 本鎖糖鎖をもつ抗体をラージスケール調製し、精製抗体を得た。これらを用いて FcγRIIIa との相互作用解析と、抗体依存性細胞傷害活性の測定を行った。その結果、糖鎖構造によって多少の違いはあったものの、分岐型糖鎖を有するトラスツズマブは概ね、2 本鎖糖鎖を有する従来の抗体と類似した性質を示すことが明らかになった。

The major glycoforms of the *N*-glycans on the IgG-Fc region are bi-antennary complex-type *N*-glycans, while multi-branched complex-type *N*-glycans are not typically found, and little is known about the properties of such IgGs with multi-branched *N*-glycans. In this study, we prepared IgGs with multi-branched *N*-glycans on the Fc region using a combination of the glycosynthase/oxazoline substrate-based *N*-glycan remodeling technique and successive reactions with glycosyltransferases. We also examined the effector functions of IgGs with tri- and tetra-antennary *N*-glycans on their Fc region, and found that the majority had similar properties to IgGs with ordinary bi-antennary *N*-glycans.

antibody, N-glycan, glycosyltransferase

講演番号：4G01-06
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:00～ ミーティングルーム G

ウシの消化管と軟骨組織に含まれるグリコサミノグリカンの組成分析

Analysis of glycosaminoglycan in cartilaginous parts and alimentary canal of cattle

○武田-奥田 尚子、田村 純一（鳥取大農）
○Naoko TAKEDA-OKUDA, Jun-ichi TAMURA (Fac. Agric., Tottori Univ.)

結合組織を構成する主成分であるコンドロイチン硫酸 (CS)は、水分保持や衝撃緩和などの物理的機能や、細胞増殖や細胞接着などの様々な生化学機能を持つ。我々はこれまでにニホンジカ(*Cervus nippon*)の気管や肩甲軟骨などの軟骨部位と胃や腸などの消化管に含まれる CS やデルマタン硫酸(DS)、ヒアルロナン(HA)の組成と含有濃度の分析を行い、消化管の部位によって CS や DS の組成や含有濃度が異なることを明らかにしてきた。一方、同じウシ目であるウシ(*Bos taurus*)の消化管と軟骨部位の系統的な糖鎖分析は行われておらず、種間の比較がなされていない。本研究では、ウシの消化管と軟骨部位の CS と DS の硫酸化パターンを分析することで、CS などの機能性糖鎖の微細構造の種間での相違を明らかにし、CS、DS、HA の各部位での含有濃度を調査することで、機能性糖鎖の生物資源として家畜や駆除獣の未利用部位を有効利用する基盤形成を目指した。

ウシの各部位から得られた精製糖鎖は、コンドロイチナーゼ ABC やコンドロイチナーゼ ACI を用いて糖鎖を二糖単位に分解し、HPLC で分析した。その結果、軟骨部位には脱脂乾燥物 100 g 中に 1 g 以上の CS と DS が含まれており、軟骨部位では CS/DS 比が高く、消化管では低いことを明らかにした。

Chondroitin sulfate (CS) shows physical and biological properties. We have analyzed CS, dermatan sulfate (DS), and hyaluronan (HA) in cartilaginous parts (trachea and scapula) and alimentary canal (stomach and intestines) of Sika deer (*Cervus nippon*), and clarified that the composition and concentration of CS and DS depend on the part of these organs. However, CS, DS, and HA of cattle (*Bos taurus*) have never been investigated. In order to effectively apply the unused parts of domestic animals as well as eliminated animals, we started to analyze the composition and concentration of CS, DS, and HA in cartilaginous parts and alimentary canal of cattle.

Well-purified glycans derived from these parts have been digested with chondroitinase ABC or ACI to the corresponding disaccharides which were analyzed by HPLC. Cartilaginous parts contained CS and DS at more than 1 g per 100 of dry-defatted parts. The ratio of CS/DS were high in cartilaginous parts while low in alimentary canal.

Chondroitin sulfate, Cattle, Glycosaminoglycan

講演番号：4G01-07
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:00～ ミーティングルーム G

動物組織に含まれるコンドロイチン硫酸/デルマタン硫酸の分子量
Molecular weight of chondroitin sulfate/dermatan sulfate contained in the tissues of animals

○田村 純一、九里 幸汰、武田-奥田 尚子（鳥取大農）
○Jun-ichi Tamura, Kota Kunori, Naoko Takeda-Okuda (Tottori Univ.)

グリコサミノグリカン(GAG)のうち，N-アセチルガラクトサミンを構成糖に持つものとして，コンドロイチン硫酸(CS)とデルマタン硫酸(DS)が挙げられる。DS は CS のグルクロン酸の C-5 位が異性化したジアステレオマーである。CS と DS は二糖を構成単位としており，しばしばこの二糖が共重合した直鎖糖鎖を構成するので CS/DS と表す。我々はこれまでに数種類のサメなどの軟骨魚類の異なる部位[1]や鹿茸[2]に加え，ウシ(*Bos taurus*)やニホンジカ(*Cervus nippon*)の軟骨部位と消化管に含まれる CS/DS の組成と含有濃度の違いを報告した。しかし，各部位の CS/DS の分子量分析は行われておらず，生物種や部位間での比較ができていない。

本研究では，ウシやニワトリなどの陸上生物の軟骨部位と消化管，そして魚類のいくつかの異なる部位に含まれる CS/DS の分子量を調査した。ニホンジカ，ウシ，ニワトリ(*Gallus gallus domesticus*)，サメなどの異なる生物から精製された CS/DS の分子量を分析した。その結果，軟骨部位においては生物種間で分子量が異なり，消化管は軟骨部位に比べて分子量が小さいことが明らかとなった。

Chondroitin sulfate (CS) and dermatan sulfate (DS) are one of the glycosaminoglycan (GAG) family members possessing N-acetylgalactosamine. DS is a diastereomer of CS at C-5 of glucuronic acid. CS polysaccharide is partially but often epimerized to DS. Such a GAG is described as CS/DS. We have already reported the characteristic composition, sulfation pattern, and concentration of CS/DS derived from cartilaginous parts and alimentary canals of cattle (*Bos taurus*) and Sika deer (*Cervus nippon*), in addition to cartilaginous fish [1] and velvet antler of sika deer [2]. However, molecular weight of CS/DS from these parts have not yet reported. We investigated the molecular weight of CS/DS from cartilaginous parts and alimentary canals of cattle and chicken (*Gallus gallus domesticus*), and from several parts of fish. Cartilaginous parts form sika deer, cattle, chicken, and sharks showed different size of CS/DS among animals. Molecular weight of CS/DS from alimentary canals of these animals were smaller than those from cartilaginous parts.

[1] N. Takeda-Okuda et al., *Carbohydr. Res.*, **424**, 54 (2016).
[2] N. Takeda-Okuda et al., *Glycoconj. J.*, **36**, 127 (2019).

Chondroitin sulfate, Dermatan sulfate, Molecular weight

発表責任者：田村　純一（jtamura@tottori-u.ac.jp）

講演番号：4G01-08
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:00～ ミーティングルーム G

マトリグリカンの合成～Xyl-GlcA 二糖のオリゴマー化～

Synthesis of matriglycan～oligomerization of Xyl-GlcA disaccharide～

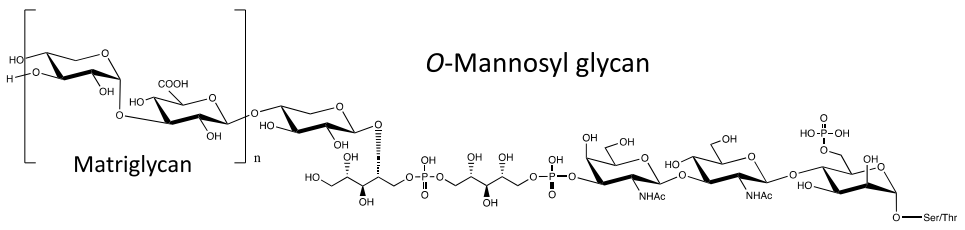
○田村 敬裕[1]、大村 優華[2]、田村 純一[1,2] ([1]鳥取大院・連大農、[2]鳥取大院・農)
○Takahiro TAMURA[1], Yuka Omura[2], Jun-ichi Tamura[1,2] ([1]United Grad. School Agric. Sci., Tottori Univ., [2]Dep. Agric., Grad. School Sust. Sci., Tottori Univ.)

マトリグリカンはキシロース(Xyl)とグルクロン酸(GlcA)からなる二糖の繰返し多糖であり、*O*-マンノシルグリカン(MG)の非還元末端に位置する。マトリグリカンは細胞外マトリックスであるラミニンと直接相互作用して基底膜と細胞骨格とをつなぐことで筋繊維の安定化の役割を担っている。近年、*O*-MG の欠損が筋ジストロフィーの発症の原因の一つであることが明らかになってきた。*O*-MG の形成は還元側から逐次相当する糖転移酵素により行われ、その非還元末端がラミニンと結合するため，糖鎖のどの部分が欠損しても発症の原因となる。ラミニンと直接相互作用するマトリグリカンの合成は医学・薬学的に重要である。そこで今回、Xyl と GlcA の二糖からなる繰返しオリゴ糖を標的として合成を行った。

GlcA の 2,4 位水酸基を Ac 基で保護した受容体(**1**)と、Xyl 供与体(**2**)とを縮合し Xyl-GlcA(**3**)を合成した。得られた二糖を酸加水分解による脱保護後、アノマー 異性体を分離して α 結合したトリオールとした後に、Xyl 残基の 2,4 位水酸基を選択的に保護して二糖(**4**)を得た[1]。その後、**4** の 3 位水酸基を保護して二糖ユニット(**5**)を得た。これを供与体と受容体に誘導し、互いに縮合することで Xyl-GlcA 二糖を繰返し単位とするオリゴマーの合成に成功した。

Matriglycan is a glycan part of *O*-mannosyl glycan (MG) in muscle tissue. Matriglycan is composed of a repetitive disaccharide unit with the α-Xyl and β-GlcA. *O*-MG elongates via many specific glycosyl transferases that accurately identify the structures of the acceptors. The synthesis of the matriglycan moiety that directly interacts with laminin is medically and pharmaceutically important. We synthesized repeating oligosaccharides consisting of the disaccharides of Xyl and GlcA. We achieved to get α-linked Xyl-GlcA selectively. Finally, we succeeded to obtain the oligomers by using the corresponding disaccharide unit.

[1] T. Tamura, Y. Omura and J. Tamura, *J. Org. Chem.*, **85**, *2020*, 12935-12946.



Matriglycan, *O*-Mannosyl glycan, muscle dystrophy

発表責任者：田村　敬裕（takatamura1129@yahoo.co.jp）

講演番号：4G01-09
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:00～ ミーティングルーム G

Schizosaccharomyces pombe における推定α-ガラクトース転移酵素 10 遺伝子の機能解析
Functional analysis of multiple α-galactosyltransferases in *Schizosaccharomyces pombe*
○福永 嵩大[1]、田中 直孝[2]、古本 敏夫[2]、中北 愼一[3]、大橋 貴生[4]、樋口 裕次郎[1]、前川 裕美[1]、竹川 薫[1] ([1]九州大農、[2]香川大農、[3]香川大総合生命、[4]摂南大理工)
○Takamasa FUKUNAGA[1], Naotaka TANAKA[2], Toshio FURUMOTO[2], Shinichi NAKAKITA[3], Takao OHASHI[4], Yujiro HIGUCHI[1], Hiromi MAEKAWA[1], Kaoru TAKEGAWA[1] ([1]Kyusyu Univ.Faculty of Agriculture, [2]Kagawa Univ.Faculty of Agriculture, [3]Kagawa Univ.Life Science Research Center, [4]Setsunan Univ.Department of Life Science)

分裂酵母の細胞表層ガラクトース含有糖鎖は、凝集素タンパク質 Gsf2 との相互作用を介して非性的凝集反応を引き起こすことで、同種間の認識に重要な役割を果たす。糖鎖へのガラクトース付加は、ゴルジ体内腔に局在する糖転移酵素によって行われるが、分裂酵母ゲノムに存在する推定ガラクトース転移酵素(GalT)10 遺伝子(*gma12*$^{+}$, *gmh1-6*$^{+}$, *otg1-3*$^{+}$)の詳細な機能は不明な点も多い。本研究では GalT 遺伝子各単独破壊株と、10 重破壊株(Δ10GalT)に各 GalT 遺伝子を単独で導入した株を作成し、それらの株の糖鎖構造を比較解析することによって、各 GalT の基質特異性の解明を目指した。その結果、Gma12,Gmh1,Gmh2,Gmh3,Gmh6,Otg2,Otg3 が単独でガラクトース転移活性を示すことが明らかになった。また Gma12 と Gmh6 は主に *O*–結合型糖鎖に、また Gmh1,2,3 は主に *N*-結合型糖鎖のガラクトースの付加に関与していることがわかった。Otg2,Otg3 と高い相同性を持つ Otg1 は、予想に反して GalT 活性を示さなかった。そこで、1,2-GalT である Gma12,Gmh1,Gmh2,Gmh3,Gmh6 と Otg1 を同時に導入した株を作成し、それらの株の糖鎖構造を比較した。その結果 Gmh6 との共発現することによってはじめて、Otg1 はガラクトース転移活性を示した。以上の結果から、分裂酵母におけるガラクトース鎖は、各糖転移酵素の基質特異性により一定の合成経路が存在することが明らかになった。

In the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*, galactose (Gal) residues are transferred to *N*- and *O*-linked oligosaccharides of glycoproteins by galactosyltransferases. Although the galactomannans of *S. pombe* are important for cell-cell communication (e.g. non-sexual aggregation), how their biosynthesing starts in the cells has been unclear. Previously, we constructed and characterized a decuple α-galactosyltransferase disruptant (Δ10GalT). Δ10GalT strain lacks α-Gal residues completely, thereby α-galactosyltransferases in *S. pombe* are ten in total. Here, we report that all galactosyltransferases confer galactosylation, based on a single-expression and co-expression of α-galactosyltransferase in Δ10GalT strain. High-performance liquid chromatography (HPLC) analysis of pyridylaminated *O*-linked oligosaccharides showed that two glycosyltransferase (GT) family 34 α1,2-galactosyltransferases (Gma12 and Gmh6), and GT family 8 α1,3-galactosyltransferases (Otg2 and Otg3) were involved in galactosylation of *O*-linked oligosaccharides. NMR of *N*-glycans revealed that GT family 34 α1,2-galactosyltransferase (Gmh1, Gmh2, and Gmh3) are required for the galactosylation of *N*-linked oligosaccharides. Furthermore, Otg1 showed α1,3-galactosyltransferase activity under co-expression with Gmh6. These substrate specificities of α-galactosyltransferase explain the ordered assembly of the *O*-glycans.

fission yeast, galactosyltransferase, α-galactosylation

発表責任者：竹川薫（takegawa@agr.kyushu-u.ac.jp）

講演番号：4G01-10
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:00～ ミーティングルーム G

オリーブアナアキゾウムシの誘引物質の探索

Identification of agents for attracting　olive weevil, Pimelocerus perforatus

○髙野 奈海、岸本 憲人（小豆島ヘルシーランド株式会社）
○Nami TAKANO, Norihito KISHIMOTO (Shodoshima Healthyland Co., Ltd.)

近年、健康志向の高まりからオリーブオイルの需要が増加し、日本国内でオリーブ栽培地が拡大している。日本におけるオリーブ栽培において、害虫であるオリーブアナキゾウムシ *Pimelocerus perforatus* (Roelofs)の被害は深刻な問題である。オリーブアナアキゾウムシは、オリーブの枝や幹に甚大な食害を与え、オリーブの衰弱や枯死をまねく。現在、オリーブアナアキゾウムシの防除策として農薬（殺虫剤）の使用が一般的であるが、環境への負荷が懸念されている。そこで、我々は無農薬・減農薬に向けて、オリーブアナアキゾウムシに対する誘引剤を用いた捕虫器による防除策を検討している。本研究では、オリーブアナアキゾウムシの行動解析による誘引物質の探索を行ったので、その結果について報告する。まず、オリーブアナアキゾウムシが自身の糞に興味を示すことを観察したので、調製した糞懸濁液を染み込ませた濾紙にも誘引されることを確認した。次に、ガスクロマトグラフィーにより糞懸濁液中の揮発性物質を調べたところ、ベンズアルデヒドが検出された。濃度別にベンズアルデヒドを染み込ませた濾紙を用いてオリーブアナアキゾウムシの誘引反応を調べたところ、濃度依存的に誘引強度が高まった。本結果は、オリーブアナアキゾウムシの誘引物質の一つを明らかにし、新たな防除策の確立に向けて有意義であると考えている。

Recently, the consumption of olive oil in Japan is increasing owing to its health effects. Although Shodoshima is the birth place of olive cultivation in Japan, olive growers have been expanding from Kagawa to many places in Japan. The olive weevil, *Pimelocerus perforatus* (Roelofs), is a serious insect pests of olive cultivation in Japan. The damage is caused by feeding on olive bark and leaves. Therefore, control of this species is required for olive cultivation in Japan. However, few studies have examined its ecological and behavioral traits. The objective of the present research is to identify agents for attracting them in the hope of developing an attractant-baited trap for *P. perforatus*. First, we observed that the *P. perforatus* adults seemed to be attracted to their own feces and then found that they were still instinctively attracted to a piece of filter paper soaked with the feces suspension. Next, we tried to identify volatile compounds as an attractant in the feces using a gas chromatography. Benzaldehyde was detected in the feces suspension. The *P. perforatus* adults were strongly attracted to a piece of paper filter soaked with benzaldehyde. The attracting effect depended on the concentration of benzaldehyde. Our findings provide an agent for attracting *P. perforatus* adults effectively.

olive weevil, attractant, pest control

講演番号：4G01-11
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:00～ ミーティングルーム G

Effect of Temperature and Salt Conditions on Biological Activities and Phytochemicals of Brown Rice at Germination Stage

○Mehedi Hasan, Tran Dang Xuan (Hiroshima University)

Demands for high medicinal and nutritional value of rice (*Oryza sativa* L.) have been rising worldwide. It is demonstrated that germinated brown rice (GBR) is more enriched with the basic nutritional components compared to white rice grain. Studies reported that germination under stress conditions enhanced the antioxidant activity and phytochemical contents in GBR. With a view to improve the nutritional value of GBR, this study was conducted on Koshihikari (one of the most cultivated and popular cultivars in Japan). Seed germination was induced with different treatments of salinity (0, 75 and 150 mM NaCl), temperature (30 and 40˚C) and soaking period (24 and 36 hours). In this study treatment B_1 means 36 h. soaking with 75mM NaCl at 30˚C, B_2 means 36 h. soaking with 150mM NaCl at 30˚C; C_1 means 24 h. soaking with 75mM NaCl at 40˚C, and D_2 means 36 h. soaking with 150mM NaCl at 40˚C, subsequently. The results explored that, high salinity (150 mM NaCl), high temperature (40˚C) and long soaking period (36 hours) increased the biological activities of GBR, while, higher quantity of momilactone A and B was found in moderate salinity (75 mM NaCl), soaking period (24 hours), and temperature (40˚C). This study revealed a higher amount of MB in C_1 treatment (26.88±0.50a µg/g DW than MA in C_1 treatment (13.67 ± 0.62^{a} µg/g DW).The results also showed higher antioxidant activities in B_2 (DPPH, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl: 1.15 ± 0.05^{f} mg/mL and ABTS, 2,2′-azino-bis: 1.84 ± 0.02^{d} mg/mL) and D_2 (β-carotene: 95.66 ± 4.35^{a}). It also exhibited higher potential of α-amylase inhibitory activity in B_1 (0.86 ± 0.05^{d} mg/mL). However, phenolics like para-coumaric acid was reported comparatively lower in high salinity treatment C_1 (1.95 ± 0.13^{d} µg/g DW) whereas tricin was recorded comparatively higher in D_2 (1.16 ± 0.02^{bc} µg/g DW). This study demonstrated strong correlation ($p < 0.05$) between MA and MB (0.963), ABTS antioxidant activities and MB (0.541) and moderate correlation ($p < 0.05$) between tricin and MB (0.446); α-amylase and MB (0.405); reducing power and DPPH (0.489); ABTS and MA (0.440), respectively. Thus, this study demonstrates and suggests that stress conditions through high salinity and temperature with long soaking period can improve biological activities and nutritional value of GBR. Therefore, this approach may be used to prevent type-2 diabetes, cancer and other related human diseases as well as provide high nutritional foods from GBR.

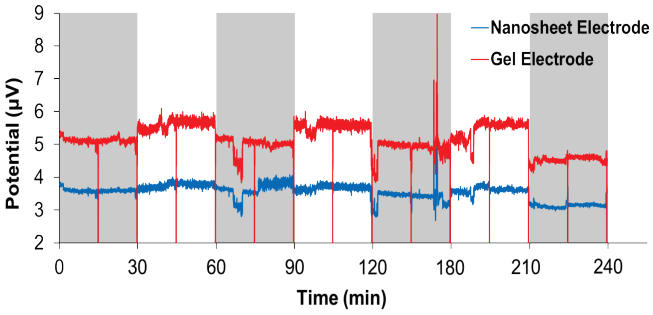
Mehedi@2108

講演番号：4G01-12
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:00～ ミーティングルーム G

超軽量・柔軟な導電性ナノシートを用いた植物葉の生体電位測定

Biopotential measurement of plant leaves with ultra-light and flexible conductive polymer nanosheets

○谷口 広晃[1]、秋山 和広[2]、藤枝 俊宣[3,4] ([1]早大先進、[2]早大学院、[3]東工大生命、[4]早大ナノ・ライフ創研機構)
○Hiroaki TANIGUCHI[1], Kazuhiro AKIYAMA[2], Toshinori FUJIE[3,4] ([1]Sch. Adv Sci. and Eng., Waseda Univ., [2]Waseda Univ. Senior High School, [3]Sch. Life Sci. and Tech., Tokyo Tech., [4]Res. Org. Nano & Life Innov., Waseda Univ)



本研究では自立型導電性高分子ナノシート(以下、導電性ナノシート)を使用した植物葉の生体電位測定について検証し、葉面電位の長期間測定方法の確立を目指した。導電性ナノシートは超薄型軽量構造(厚さ 300 nm、150 μg)により、化学接着剤を使用することなく植物葉(Angelica keiskei Koidzumi)の静脈や微細な凹凸に追従した。従来の生体電極であるゲル電極を用いた測定では貼付後、2 週間程度でアクリル接着剤による葉面の変色が確認された。一方、ナノシート電極を貼付した葉では、貼付後最大 1,500 時間(約 2 か月)経過しても変色は確認されなかった。この時、ナノシート電極を使用した生体電位測定ではゲル電極を使用した場合と類似した生体電位パターンを観測した。また、周期的な発光ダイオード(LED)照射下で生体電位パターンが変化することも確認した。導電性ナノシートは、農業や食品化学の応用における植物の生理活性をリアルタイムで分析する低侵襲な葉面電位計測法としての利用が期待される。

This study demonstrated the feasibility of free-standing conductive polymer nanosheets (referred to as “conductive nanosheets”) as bioelectrodes for plant leaves. The conductive nanosheet exhibited ultra-conformability and physical adhesion to unevenly structured surfaces, such as the veins of a plant leaf(Angelica keiskei Koidzumi), without the use of chemical glue, owing to the ultra-thin and light structure (300 nm thick, 150 μg). The conventional bioelectrodes such as pre-gel electrodes caused discoloration 14 days after application, owing to the acrylic glue utilized for adhesion. However, the plant leaf covered with the nanosheet electrode did not show discoloration even after up to approximately 1,500 hours (about 2 months). We also discovered that the biopotential pattern was altered under periodic light-emitting diode (LED) irradiation. Such minimally invasive measurements using the conductive nanosheets can pave the way for a emerging method to analyze the bioactivity of plants in the application of agriculture and food science.

Polymer nanosheet, Biopotential measurement, Plant leaf

発表責任者：藤枝俊宣（t_fujie@bio.titech.ac.jp）

講演番号：4G01-13
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:00～ ミーティングルーム G

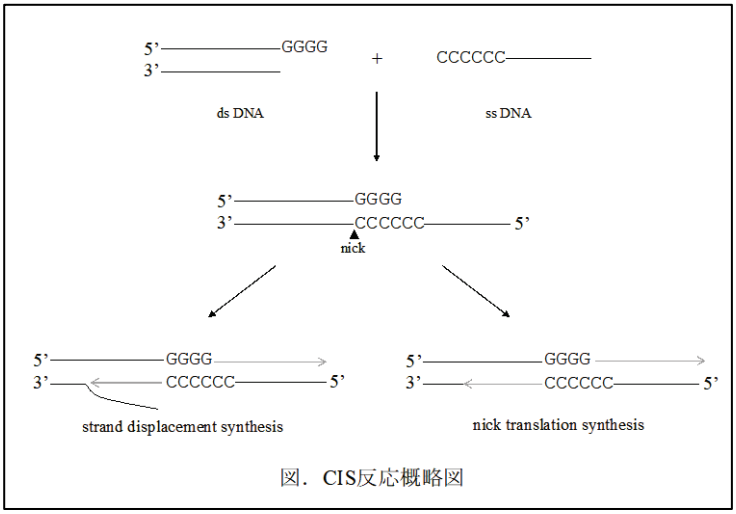
Taq DNA polymerase による新規タイプの CIS 反応

A novel type of CIS reaction mediated by *Taq* DNA polymerase

○川原 昌太郎、永田 裕二、大坪 嘉之（東北大学院生命）
○Shoutarou KAWAHARA, Yuji NAGATA, Yoshiyuki OHTSUBO (Tohoku Univ.)

【要旨】

我々が CIS（clamping-mediated incorporation of single-stranded DNA with concomitant DNA syntheses）反応と命名した反応[1]は、2 本鎖 DNA の 3’末端突出に 1 本鎖 DNA が DNA 合成を伴って取り込まれる反応である（図）。これまで CIS 反応を起こす polymerase としては、MMLV(Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase)や HIV-1 (Human Immunodeficiency Virus type1)などが有する逆転写酵素(RT)のみが知られてきた。中でも MMLV-RT については詳細な解析がされており、高効率で CIS 反応が可能であることが示されている。



図．CIS反応概略図

本研究では新たに、DNA polymerase である *Taq* DNA polymerase にも CIS 反応を触媒する活性が有ることを見出した。従来の反応では、図の左下に示したように strand displacement synthesis が起きるが、*Taq* DNA polymerase を用いた反応では、図の右下に示したように nick translation synthesis が起きる。nick 部分は ligation によって容易に連結可能であることなど、今回見出した反応は、反応特性として優れた点を有しており、CIS 反応の利用可能性を向上させるものである。

[Abstract]

CIS reaction is a reaction, in which a single strand DNA is incorporated to 3’-overhang of a double strand DNA with concomitant DNA synthesis. To date, a series of reverse transcriptase has been shown to catalyzes the CIS reaction, which involves strand displacement synthesis. In this study, we found that *Taq* DNA polymerase has an activity to catalyze the CIS reaction and that the reaction property differs from those by the RTs, in that it undergoes nick translation. The new type of CIS reaction has some superior characteristics, which might be of use for biotechnological applications.

[1] Ohtsubo, Y., Sasaki, H., Nagata, Y. & Tsuda, M. Optimization of single strand DNA incorporation reaction by Moloney murine leukaemia virus reverse transcriptase. DNA Res. 25, 477–487 (2018).

CIS reaction, *Taq* DNA polymerase

発表責任者：川原昌太郎（s.kawahara@ige.tohoku.ac.jp）

講演番号：4G01-14
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:00～ ミーティングルーム G

Discrimination of plasmid-harboring and -free strains using single-cell Raman Spectroscopy
○Huiting Zhang[1], Chiho Suzuki-Minakuchi[1,2], Motomu Matsui[3], Masataka Yamaguchi[4], Misak Kawato[4], Nanako Kanno[4], Kazunori Okada[1], Wataru Iwasaki[3], Shinsuke Shigeto[4], Hideaki Nojiri[1,2] ([1]BRC, UTokyo, [2]CRIIM, UTokyo, [3]Graduate School of Science, UTokyo, [4]Kwansei Gakuin Univ)

[Introduction] Plasmids provide functional benefits to the host such as antibiotic-resistance and novel metabolic capacity for xenobiotics, and promote the rapid evolution and adaption of bacteria (Trevors J T, 1986). Many studies have clarified the details of the plasmid effects on host cell physiology, but all of those studies were done at population level. This may hide some variation among the individual cells, and single cell level analyses will be necessary. Raman spectroscopy is a non-invasive and label-free technology, it can detect vibrations of chemical bonds in molecules such as nucleic acids, protein, lipids and carbohydrates which generate strong Raman scattering signals, enabling characterization of bacteria at single cell level (Palonpon *et al*, 2013). Here, on the basis of Raman spectroscopy techniques, we developed a method to distinguish between plasmid-harboring and -free bacterial strains at the single-cell level without harming or modify cells.

[Methods] In this study, *P. putida* KT2440 and *E. coli* W3110 were used as the hosts for the two types of plasmids : the incompatibility group (Inc) P-1β plasmid pB10 and IncP-1α plasmid RP4. Each strain with or without plasmid pB10 or RP4 was cultured in minimum medium until it reached log and stationary phase, and gathered cells were taken for Raman measurements. 30-50 spectra of each plasmid-host combination were recorded, denoised using Singular Value Decomposition (SVD) and classified using Random Forest (RF) algorithm (Lee S *et al*, 2013).

[Results and Discussion] Applicaiton of the combination of Raman spectroscopy technique and RF algorithm to *P. putida* KT2440 strains at both log and stationary phases successfully discriminated plasmid-free strain from pB10- or RP4-harboring strains. These results provide the possibility to detecting the plasmid transfer using Raman spectroscopy. If single cell-picking technologies, such as laser microdissection or optical tweezer, are combined, this new method can be applied to clarify the interaction between plasmid and host cell at the level of single cells in real time. On the other hand, I was also able to distinguish plasmid-free *E. coli* W3110 strain from pB10- or RP4-harboring strains with Raman spectra at log phase, but failed to distinquishing these strinas with Raman spectra at stationary phase. It may be caused by different growth conditions of strains or some other effects like sampling preparation process, etc. I am still looking for the accurate reason.

.

Plasmid, Single-cell, Raman spectra

講演番号：4G03-01
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:00～ ミーティングルーム G

Flavobacterium johnsoniae 由来 α-1,2-グルコシダーゼの立体構造解析

Structural analysis of α-1,2-glucosidase from *Flavobacterium johnsoniae*

○中村 駿太郎[1]、中井 博之[2]、朴 龍洙[1,3]、宮崎 剛亜[1,3] ([1]静大院・総合科技・農、[2]新潟大農、[3]静大グリーン科技研)
○Shuntaro NAKAMURA[1], Hiroyuki NAKAI[2], Enoch. Y PARK[1,3], Takatsugu MIYAZAKI[1,3] ([1]Dept. Agric. Grad. Sch. Integr. Sci. Tech., Shizuoka Univ., [2]Niigata Univ., [3]Res. Inst. Green Sci. Tech., Shizuoka Univ.)

【目的】糖質加水分解酵素ファミリー65 (GH65) はホスホリラーゼと加水分解酵素が共存するファミリーであるが、立体構造の報告はホスホリラーゼに限られていた。我々はこれまでに *Flavobacterium johnsoniae* 由来の GH65 酵素 (FjGH65A) がコージビオースを特異的に加水分解する新奇な α-1,2-グルコシダーゼであることを明らかにした。本研究では FjGH65A の加水分解反応メカニズムの解明を目的として酵素反応産物のアノマー解析と立体構造解析を行った。

【方法・結果】精製した組換え FjGH65A を用いてコージビオースと α-glucosyl fluoride に対して酵素反応を行った。その反応産物を TSKgel Amide-80 を用いた順相 HPLC により分析したところ、FjGH65A は反応の初期段階から分解産物として β-グルコースを蓄積することがわかった。よって FjGH65A はアノマー反転型の加水分解酵素であると示唆された。FjGH65A の結晶はハンギングドロップ蒸気拡散法によって作製し、高エネルギー加速器研究機構にてX線回折測定を行った。位相の決定は $KAuCl_4$ にソーキングした単結晶を用いた単波長異常分散法により行い、FjGH65A の立体構造はアポ構造とグルコースとの複合体構造をそれぞれ 1.8 および 1.4 Å 分解能で決定した。また、FjGH65A の結晶は空間群 *C*2 に属し、結晶学的非対称単位中に 3 分子存在している。結晶構造の分子のパッキングとゲルろ過クロマトグラフィーの結果から、本酵素は 6 量体を形成していると考えられた。

Glycoside hydrolase family 65 (GH65) contains glycoside phosphorylases and glycoside hydrolases. Only structures of glycoside phosphorylases have been reported among GH65 enzymes to date. We previously discovered a novel α-1,2-glucoside hydrolase (FjGH65A) specific for kojibiose. In this study, we analyzed anomers of glucose produced by FjGH65A and determined the crystal structure to elucidate the structure-function relationship of FjGH65A.

Reaction mixtures containing purified recombinant FjGH65A and either kojibiose or α-glucosyl fluoride were analyzed by normal-phase HPLC using TSKgel Amide-80. β-Glucose initially accumulated in the both reactions, indicating that FjGH65A employs an inverting mechanism. Single crystals of FjGH65A were obtained and analyzed using an X-ray source at the PF beamlines. Initial phase was calculated from the single-wavelength anomalous dispersion dataset of the crystal soaked with $KAuCl_4$. The structures of FjGH65A in apo form and in complex with glucose was determined at 1.8- and 1.4-Å resolutions, respectively. FjGH65A was suggested to form a hexamer by crystal packing and gel filtration chromatography analysis.

kojibiose, dextran, crystal structure

発表責任者：宮崎剛亜（miyazaki.takatsugu@shizuoka.ac.jp）

講演番号：4G03-02
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:00～ ミーティングルーム G

カイコ由来 GH32 β-フルクトフラノシダーゼ BmSUC1 の立体構造解析

Structural analysis of GH32 β-fructofuranosidase BmSUC1 from *Bombyx mori*

○宮崎 剛亜[1,2]、大場 望美[2]、朴 龍洙[1,2] ([1]静大グリーン科技研、[2]静大農)
○ Takatsugu MIYAZAKI[1,2], Nozomi OBA[2], Enoch Y. PARK[1,2] ([1]Res. Inst. Green Sci. Tech., Shizuoka Univ., [2]Fac. Agric., Shizuoka Univ.)

【目的】カイコ（*Bombyx mori*）の中腸には 2 種類のスクロース加水分解酵素（BmSUC1 および BmSUH）が発現しており、それぞれ Glycoside Hydrolase family 32（GH32）および family 13 subfamily 17（GH13_17）に属している。GH32 酵素はほとんどの動物が有しておらず、BmSUC1 はバクテリア由来 GH32 酵素と比較的アミノ酸配列相同性が高いため、バクテリアからの水平伝播に由来するものと考えられている。また、BmSUC1 はクワの葉に含まれる糖類似アルカロイドである 1-deoxynojirimycin に阻害されないため、糖類似アルカロイドへの耐性獲得に寄与しているとの報告がある。我々はこれまでに GH13_17 に属する BmSUH の X 線結晶構造解析を行い、その基質特異性と構造の相関を明らかにした[1]。本研究では、β-fructofuranosidase である BmSUC1 の X 線結晶構造解析を行った。
【方法と結果】大腸菌 BL21 (DE3) にて発現させた組換え BmSUC1 を精製し、基質特異性の解析と結晶化をした。BmSUC1 はスクロース≒ラフィノース＞1-ケストース＞ニストースの順によく加水分解し、多糖であるイヌリンやレバンに対しても活性を示した。結晶の X 線回折データは PF BL5A ビームラインで収集し、*Thermotoga maritima* 由来 β-fructofuranosidase を鋳型とした分子置換法により、1.80 Å 分解能で決定した。BmSUC1 は GH32 に共通する five-bladed β-propeller ドメインと β-sandwich ドメインに加え、一部のバクテリア酵素に見られる N 末端の α ヘリックス構造を有していた。求核触媒残基変異体 D63A とスクロースとの複合体構造も 1.95 Å 分解能で決定し、基質の認識に関与するアミノ酸残基を同定した。また、糖類似アルカロイドである 1-deoxynojirimycin には阻害されないが、1,4-dideoxy-1,4-imino-D-arabinitol に拮抗的に阻害され、K_i 値は 0.8 mM と算出された。

Bombyx mori has two sucrose-hydrolyzing enzymes, BmSUC1 and BmSUH, belonging to GH32 and GH13_17, respectively. BmSUC1 has been thought to be obtained *via* horizontal gene transfer from bacteria and to contribute to tolerance to sugar-mimic alkaloids such as 1-deoxynojirimycin, which are contained in mulberry leaves. We previously determined the crystal structure of BmSUH[1]. In this study, we analyzed the substrate specificity and determined the crystal structure of BmSUC1. Recombinant BmSUC1 showed hydrolytic activity towards not only sucrose and raffinose but also 1-kestose, nystose, inulin, and levan. The crystal structures of BmSUC1 in apo form and mutant D63A complexed with sucrose were determined. BmSUC1 has a five-bladed β-propeller domain, a β-sandwich domain, and an N-terminal α-helix. BmSUC1 was competitively inhibited by a sugar-mimic alkaloid 1,4-dideoxy-1,4-imino-D-arabinitol.

1) Miyazaki and Park, *J. Biol. Chem.* **295**, 8784–8797, 2020.

crystal structure, silkworm, GH32

発表責任者：宮崎剛亜（miyazaki.takatsugu@shizuoka.ac.jp）

講演番号：4G03-03
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:00～ ミーティングルーム G

老化関連β-ガラクトシダーゼおよびその前駆体の構造と機能に関する研究

Study on the structure and function of senescence associated ß-galactosidase and its precursors

○清水 まるみ[1]、長谷川 果南[2]、平野 貴子[1,2]、西尾 俊幸[1,2]、袴田 航[1,2]([1]日大院生資科、[2]日大生資科)

○Marumi SHIMIZU[1], Kanan HASEGAWA[2], Takako HIRANO[1,2], Toshiyuki NISHIO[1,2], Wataru HAKAMATA[1,2] ([1]Graduate school of Bioresource Sciences, Nihon Univ., [2]Chem. and Life Sci., College of Bioresource Sciences, Nihon Univ.)

老化細胞では老化関連 β-ガラクトシダーゼ（Senescence Associated β-Galactosidase, SA β-Gal）の活性が亢進しており、老化マーカーとして汎用されている。一方、私達は非老化細胞のゴルジ体に β-ガラクトシダーゼ活性を見出し、その責任タンパク質が前駆体 SA β-Gal（pSA β-Gal）であることを提唱した（*Bioorg. Med. Chem.* 2016）。これらの結果から、私達は老化細胞での SA β-Gal と 非老化細胞での pSA β-Gal の細胞内機能が異なると考えた。本研究では、はじめに SA β-Gal と pSA β-Gal の分子認識の構造的基盤を明らかにすることを目指し、*in silico* における酵素の立体構造モデルの構築と *in vitro* においてリコンビナント酵素による基質特異性・pH 感受性について検討する。

SA β-Gal は pSA β-Gal の C 末端のプロセッシングにより成熟する（*J. Biol. Chem.* 2000）。そこで、立体構造が報告されている pSA β-Gal (PDB ID: 3THD) を基にして分子動力学計算を用いた SA β-Gal の立体モデルを構築し、それらの分子認識能の違いを検討した。また、両リコンビナント酵素作製のため、ヒト細胞での発現に最適化した pSA β-Gal プラスミドを構築、それを鋳型として SA β-Gal 発現用プラスミドを作製し、得られる両組換酵素を用いて特性の評価を行うとともに、立体構造モデルの結果と比較し、SA β-Gal と pSA β-Gal の分子認識の違いを構造的側面から説明する。

The activity of senescence-associated β-galactosidase (SA β-Gal) is widely used as a marker of cellular senescence. In contrast, we reported novel β-galactosidase activity in the Golgi apparatus of non-senescent cells and proposed the precursor SA β-Gal (pSA β-Gal) as a candidate. Given these, we suggest that the intracellular functions of SA β-Gal and pSA β-Gal are different. We aimed to initially demonstrate the structural basis of molecular recognition of both enzymes. First, we try to construct the enzymes' tertiary structural models *in silico* and evaluate their property of the recombinant enzymes in *in vitro*. Processing of C-terminal of pSA β-Gal leads to maturation of the SA β-Gal. Therefore, we constructed a tertiary structure model of SA β-Gal based on reported X-ray pSA β-Gal structure using molecular dynamics calculation. Based on these models, we considered the differences in molecular recognition ability of both enzymes. A plasmid in pSAβ-Gal optimized for the expression to produce both recombinant enzymes in human cells was constructed and used as a template for constructing a plasmid for SAβ-Gal expression. Eventually, the properties of both recombinant enzymes could be evaluated. The difference in molecular recognition between SA β-Gal and pSA β-Gal could also be explained from the structural aspect by comparing with the tertiary models' results.

β-galactosidase, cellular senescence, cellular senescence marker

発表責任者：袴田　航（hakamata.wataru@nihon-u.ac.jp）

講演番号：4G03-04
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:00～ ミーティングルーム G

Aspergillus fumigatus における真菌型ガラクトマンナンのコアマンナン鎖生合成の構造基盤

Structural basis for the core-mannan biosynthesis of fungal galactomannan in *Aspergillus fumigatus*

○平 大輔、岡 拓二（崇城大生物生命）
○Daisuke HIRA, Takuji OKA (Sojo Univ.)

真菌の細胞壁とその生合成酵素は、新規抗真菌剤の標的となる可能性がある。コアマンナン合成酵素 A（CmsA/Ktr4）はα-(1→2)-マンノース転移酵素であり、*Aspergillus fumigatus* の細胞表面を覆う真菌型ガラクトマンナンのα-(1→2)-マンナン生合成を触媒する。本研究では、CmsA/Ktr4 の触媒ドメインの立体構造を X 線結晶構造解析により決定し、Mn^{2+}/GDP との複合体構造についても同様に決定した。結晶構造をもとに、受容基質とのドッキング及び分子動力学シミュレーションを行い、受容基質を含む完全な酵素基質複合体構造を推定した。推定した酵素基質複合体構造は、CmsA/Ktr4 変異体を *A. fumigatus* で発現させた際の菌糸成長からも裏付けられた。これらの結果は、新規抗真菌剤の候補となるマンナン生合成阻害剤を開発するための構造基盤を提供するものである。

Fungal cell walls and their biosynthetic enzymes are potential targets for new antifungal agents. Core-mannan synthase A (CmsA/Ktr4) is an α-(1→2)-mannose transferase that catalyzes the α-(1→2)-mannan biosynthesis of the fungal galactomannan lining the cell surface of *Aspergillus fumigatus*. In this study, the 3-D structure of the catalytic domain of CmsA/Ktr4 was determined by X-ray crystallography, and the structure of its complex with Mn^{2+}/GDP was also determined. Based on the crystal structure, docking with the receptor substrate and molecular dynamics simulations were performed to estimate the enzyme-substrate complex structure. The estimated enzyme-substrate complex structure was also supported by mycelial growth of the CmsA/Ktr4 mutant when expressed in *A. fumigatus*. These results provide a structural basis for the development of mannan biosynthesis inhibitors as candidates for novel antifungal agents.

Mannan, Aspergillus, Glycosyltransferase

発表責任者：平　大輔（hira@life.sojo-u.ac.jp）

講演番号：4G03-05
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:00～ ミーティングルーム G

シマグワ茶およびその成分イミノ糖によるα-グルコシダーゼ阻害効果の速度論的解析

Kinetic analysis of inhibition of α-glucosidase by leaf powder from Morus australis and its component iminosugars

○喬 穎[1]、中山 珠里[1]、池内 健晃[1]、伊東 昌章[2]、木村 俊之[3]、兒島 憲二[1]、滝田 禎亮[1]、保川 清[1]（[1]京大院・農、[2]沖縄高専・生物資源、[3]農研機構・食品研究部門）

○Ying Qiao[1], Juri Nakayama[1], Takeaki Ikeuchi[1], Masaaki Ito[2], Toshiyuki Kimura[3], Kenji Kojima[1], Teisuke Takita[1], Kiyoshi Yasukawa[1] ([1]Grad. Sch. of Agric., Kyoto Univ., [2]National Inst. of Technol., Okinawa College, [3]Food Res. Inst., National Agric. and Food Res.)

【目的】桑の葉はイミノ糖である 1-デオキシノジリマイシン（1-DNJ）、ファゴミン、2-*O*-α-D-ガラクトピラノシル-1-DNJ（GAL-DNJ）を含む。本研究では、桑茶中のこれらの定量とマルトースを基質としたときのこれらのα-グルコシダーゼ活性の阻害について速度論的解析を行った。

【方法と結果】桑茶抽出液の調製：シマグワ（*Morus australis*）から製造された「てだ桑茶パウダータイプ」（A）および、「てだ桑茶焙煎茶タイプ」（B）（ともに浦添市シルバー人材センター製）500 mg に沸騰水を 50 mL 加え、5 分間抽出後、吸引濾過を行った。LC-MS/MS 分析：A に含まれる 1-DNJ、ファゴミン、GAL-DNJ はそれぞれ 4.0、0.46、2.5 mg/g であり、B では 1.0、0.24、0.73 mg/g であった。α-グルコシダーゼ活性の阻害：マルトースにラット腸管アセトンパウダー粗酵素液を作用させ、生成したグルコースを定量した。pH 6、37℃において A、B、1-DNJ、ファゴミン、GAL-DNJ の IC_{50} はそれぞれ 0.36、1.1、0.00070、0.18、2.9 mg/mL であった。これらの阻害様式はいずれも競合阻害であった。pH 6～8、27～47℃において、A の阻害定数の温度依存性と pH 依存性はともに 1-DNJ と類似した。これらの結果から、桑茶の阻害活性に対する寄与は、1-DNJ が最も大きいことが示された。

【Purpose】Mulberry leaves contain iminosugars, such as 1-deoxynojirimycin (1-DNJ), fagomine, and 2-*O*-α-D-galactopyranosyl deoxynojirimycin (GAL-DNJ) that inhibit α-glucosidase. In this study, we quantified iminosugars in *Morus australis* leaves and made the kinetic analysis in the hydrolysis of maltose by α-glucosidase.

【Methods and Results】(i) Preparation of extracts of *M. australis* leaves: Boiled water (50 mL) was added to powdered (A) or roasted (B) *M. australis* leaves (Urasoe-shi silver human resources center, Urasoe, Japan). The solution was suction-filtrated, and the filtrate was collected. (ii) LC-MS/MS analysis: The concentrations of 1-DNJ, fagomine, and GAL-DNJ in A were 4.0, 0.46, and 2.5 mg/g, and those in B were 1.0, 0.24, and 0.73 mg/g, respectively. (iii) Inhibition of α-glucosidase activity: At pH 6.0 at 37ºC, the IC_{50} values of A, B, 1-DNJ, fagomine, and GAL-DNJ were 0.36, 1.1, 0.00070, 0.18, and 2.9 mg/mL, respectively. All of them exhibited competitive inhibition. At pH 6-8 and 27-47ºC, the profiles of A and 1-DNJ were very similar, suggesting that 1-DNJ is a major inhibitory component in *M. australis* leaves.

α-glucosidase, iminosugar, *Morus australis*

講演番号：4G03-06
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:00～ ミーティングルーム G

Isomaltose glucohydrolase に特徴的な Phe290 の機能解析

Functional analysis of Phe290 of isomaltose glucohydrolase

○田上 貴祥、古永 雄太、奥山 正幸、木村 淳夫（北大院農）
○Takayoshi TAGAMI, Yuta Furunaga, Masayuki Okuyama, Atsuo Kimura (Hokkaido Univ.)

Isomaltose glucohydrolase (IGase, EC 3.2.1.205)はイソマルトースの α-1,6 グルコシド結合を加水分解して β-グルコースを遊離するアノマー反転型酵素である。また、高濃度のグルコース存在下では加水分解の逆反応である縮合反応を触媒し、イソマルトースを合成する。IGase はアミノ酸配列類似性に基づいて糖質加水分解酵素ファミリー15（GH15）に分類されるが、GH15 酵素で一般塩基触媒近傍に高度に保存されているチロシン残基が IGase ではフェニルアラニン残基（Phe290）となっている。本研究では IGase に特徴的な Phe290 の機能を明らかにすることを目的として、Phe290 をチロシンに置換した変異酵素（F290Y）の機能解析および X 線結晶構造解析を行った。

F290Y の基質特異性は野生型酵素（WT）と同様であり、イソマルトース、パノースおよびイソマルトトリオースを加水分解し、その他のグルコ二糖に対する反応速度は検出限界以下であった。F290Y のイソマルトース加水分解における k_{cat} は 17.2 s^{-1}、K_m は 0.974 mM であり、WT の k_{cat}（22.0 s^{-1}）および K_m（1.09 mM）と同等であった。一方で、1 M グルコースを基質とした際の縮合反応においては、F290Y が WT よりも高いイソマルトース合成速度を示した。F290Y は結晶構造中で、他の立体構造既知 GH15 酵素と同様に Tyr290 – Tyr48 – Glu335（一般塩基触媒）の水素結合ネットワークを形成しており、これが縮合反応速度を上昇させた要因であると考えられる。IGase WT の Phe290 はこの水素結合ネットワークを解消して Tyr48 の自由度を高めることで、縮合反応を抑制している可能性がある。

Isomaltose glucohydrolase (IGase, EC 3.2.1.205) hydrolyzes α-1,6-glucosidic linkage of isomaltose with liberation of β-glucose. The enzyme also catalyzes the reverse reaction, condensation, to produce isomaltose in the presence of high concentration of glucose. Although IGase is a member of glucoside hydrolase family 15 (GH15), a tyrosine residue which is highly conserved at the active sites among other GH15 enzymes is replaced by phenylalanine (Phe290) in IGase. In the present study, we will discuss the function of Phe290 of IGase based on structural and biochemical analyses of F290Y mutant enzyme.

isomaltose glucohydrolase, GH15, reverse reaction

発表責任者：田上　貴祥（tagami@abs.agr.hokudai.ac.jp）

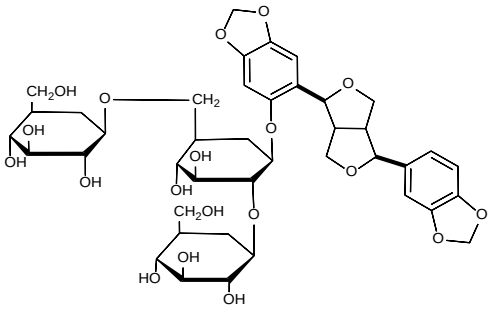
講演番号：4G03-07
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:00～ ミーティングルーム G

セサミノール配糖体加水分解酵素に対するチオグルコシド系界面活性剤の阻害効果と共結晶化の試み

Inhibition analysis and co-crystallization trial of sesaminol glycoside hydrolase with thioglucoside detergent

○矢内 太朗[1]、勝村 恵理[1]、本江 俊太郎[2]、和氣 駿之[2]、片岡 邦重[1]、高橋 征司[2]、山下 哲[1]、中山 享[2] ([1]金沢大理工・物質化学、[2]東北大院・工)
○ Taro YANAI[1], Eri KATSUMURA[1], Shuntaro HONGO[2], Toshiyuki WAKI[2], Kunishige KATAOKA[1], Seiji TAKAHASHI[2], Satoshi YAMASHITA[1], Toru NAKAYAMA[2] ([1]Kanazawa Univ., [2]Tohoku Univ.)

セサミノールはゴマ種子中に含まれているリグナンの一種であり，強い抗酸化作用を示すことから，健康食品や化粧品素材として注目を集めている．しかし，ゴマ種子中ではほとんどが難分解性のセサミノールトリグルコシド (STG，図) として存在しているため，工業的な生産には STG を効率的に分解する酵素が必要とされていた．PSTG (*Paenibacillus* STG-degrading glucohydrolase) は STG を効率的に加水分解する酵素として発見されたが, その STG 特異的な基質認識機構は明らかにされていない．我々はこれまでに PSTG の精製と結晶化を進める過程で，チオグルコシド系界面活性剤が結晶成長を促進することを見いだした．本研究では，チオグルコシド系界面活性剤が PSTG に対して競合阻害剤としてはたらくことを作業仮説として速度論解析を行い，阻害効果に基づく共結晶化の最適化を試みた．また, PSTG の基質認識に関して三次元構造モデルを基に議論する．



図．セサミノールトリグルコシド (STG)

Sesaminol is a lignan, plant secondary metabolites derived from cinnamic acid, that is found in sesame seeds. Sesaminol has attracted much attention as a health supplement and cosmetic material owing to its potent antioxidant properties. However, sesaminol is abundant in sesame seeds as sesaminol triglucosides (STG), which is highly resistant to hydrolysis of most microbial β-glucosidases. PSTG (*Paenibacillus* STG-degrading glucohydrolase) was discovered as an enzyme that efficiently hydrolyzes STG to produce sesaminol. However, the crystal structure and its STG recognition mechanism remain unsolved. We previously found that a thioglucoside detergent promotes the growth of PSTG crystals. In this study, we performed kinetics inhibition analyses of PSTG based on the hypothesis that the thioglucoside detergent acts as a competitive inhibitor of PSTG. Then, co-crystallization of PSTG and thioglucosides were optimized. We discuss the substrate recognition mechanism of PSTG based on the 3D modeling.

sesaminol, ß-glucosidase, lignan

発表責任者：山下 哲（yamashita@se.kanazawa-u.ac.jp）

講演番号：4G03-08
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:00～ ミーティングルーム G

GH30 β-1,6-グルコシダーゼのグライコシンターゼ化

Glycosynthase derived from GH30 beta-1,6-glucosidase

○安田 愛梨、三宅 英雄、勝崎 裕隆、梅川 碧里、磯野 直人（三重大院生物資源）
○Airi YASUDA, Hideo MIYAKE, Hirotaka KATSUZAKI, Midori UMEKAWA, Naoto ISONO (Mie Univ.)

グライコシンターゼは糖質加水分解酵素の求核触媒残基を非求核性残基に置換することにより，合成酵素に機能変換した変異型酵素である．グライコシンターゼは加水分解活性を持たないが，野生型酵素に対する基質とは逆のアノマー型の活性化糖供与体を用いると，糖転移反応を進行させることができる．本研究では *Halobacillus halophilus* 由来のアノマー保持型 GH30 β-1,6-グルコシダーゼを求核触媒残基の部位特異的変異によりグライコシンターゼ化し，ゲンチオビオースなど β-1,6-グルコシド結合を含むオリゴ糖の合成を試みた．

類似酵素のアミノ酸配列との比較から求核触媒残基 (E296) を予測し，これを非求核性残基に置換した 3 種類の変異型酵素 E296G, E296A, E296S を作製した．これらの変異型酵素はいずれも加水分解活性が消失した．ドナー基質として α-グルコシルフルオライドを，アクセプター基質としてグルコースを用いて反応を行ったところ，ゲンチオビオースが生成したことから，グライコシンターゼ化が成功したことが確認された．作製した変異型酵素のうち E296G が最も高い転移活性を示した．また，E296G はラミナリビオース，ソホロース，イソマルトースなどにもグルコースを転移し，β-1,6-グルコシド結合を含むオリゴ糖を生成した．

Glycosynthase is a mutant enzyme that converts to a synthetic enzyme by replacing nucleophilic catalytic residues with non-nucleophilic residues. Although glycosynthase has no hydrolytic activity, glycosyl transfer reactions occur when using an activated sugar donor of the opposite anomeric type from the substrate for wild-type enzymes. This study aims to create a glycosynthase derived from a retaining GH30 beta-1,6-glucosidase from *Halobacillus halophilus* by site-directed mutagenesis of the catalytic nucleophilic residue and to synthesize carbohydrates containing beta-1,6-glucosidic linkages.

We predicted the catalytic nucleophilic residue (E296) of this enzyme from the homology of the amino acid sequences among similar enzymes and created three site-directed mutant enzymes E296G, E296A, and E296S. Although these mutated enzymes were hydrolytically inactive, they were able to produce gentiobiose (6-*O*-β-D-glucopyranosyl-D-glucose) when using α-glucosyl fluoride as a donor and glucose as an acceptor, indicating that a glycosynthase from GH30 beta-1,6-glucosidase was successfully created. The E296G mutant had the highest transfer activity and also transferred glucose residue to some disaccharides such as laminaribiose, sophorose, and isomaltose and produced oligosaccharides containing beta-1,6-glucosidic linkages.

glycosynthase, beta-1,6-glucosidase, GH30

発表責任者：磯野直人（isono@bio.mie-u.ac.jp）

講演番号：4G03-09
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:00～ ミーティングルーム G

マルトオリゴ糖 4(6)グルコシルトランスフェラーゼのサブサイト変異に伴う 1-4/1-6 転移反応の変化
Alterations in the 1-4/1-6 transfer reaction associated with subsite mutations in maltoligosaccharide 4(6)-glucosyltransferase

○尾下 晴紀、澤田 桃、佐分利 亘、森 春英 (北大院農)
○Haruki OSHITA, Momo SAWADA, Wataru SABURI, Haruhide MORI (Hokkaido Univ.)

糖質加水分解酵素群 GH15 には，マルトオリゴ糖（Gn）やイソマルトオリゴ糖（IGn）に作用して加水分解するグルコアミラーゼ (GA)やグルコデキストラナーゼ (GD)に加え，糖転移を触媒するマルトオリゴ糖 4(6)グルコシルトランスフェラーゼ（M4(6)GT）が含まれる．M4(6)GT が生成する結合はアクセプターにより異なり，G2 および IGn ではα1-6 結合を，三糖以上の Gn ではα1-4 結合を主に生成する．本研究では，*Tepidibacillus decaturensis* 由来 M4(6)GT のサブサイト+2,+3 形成が予想されるアミノ酸残基の変異酵素の機能を解析した．

TdM4(6)GT 野生型酵素は基質 G2～G5 のうち G4 に最大速度を示した．G3 に対しても G2 の 60 倍の速度を示した．F318W と V319G では G2 と G3 の速度差は大きく減少し，V319G は G3 で最大の速度を示した。従って F318W，V319G ではそれぞれサブサイト+2,+3 の親和力が低下したと考えられた．基質 G3 に対する反応は，野生型では 1-4 転移であるが，F318W と V319G では 1-6 転移を主とし加水分解も確認された。M4(6)GT の基質アクセプターに依存する生成結合の特異性に関し，1-4 転移には Gn のサブサイト+2,+3 への結合が必要であり，これが妨げられると 1-6 転移になると考えられる。

Glycoside Hydrolase family 15 (GH15) is mainly composed of glucoamylase (GA) and glucodextranase (GD) that are inverting hydrolases acting on maltooligosaccharides (Gn) and isomaltooligosaccharides (IGn), respectively. But retaining transglucosidase maltooligosaccharide 4(6)-glucosyltransferases (M4(6)GT) have been found as GH15 members. The regioselectivity of bond generated by M4(6)GT are decided by acceptor substrate: α1-6 linkage with G2 and IGn, and α1-4 bond with G3 and longer Gn. In this study, using M4(6)GT from *Tepidibacillus decaturensis*, residues predicted to form subsites +2 and +3 were mutated, and the mutant enzymes were analyzed.

TdM4(6)GT wild-type enzyme showed the highest velocity on G4 in G2 to G5. Velocity for G3 was 60 times higher than G2. But in F318W and V319G, the G3 preference to G2 dropped significantly. V319G lost even the G4 preference. Therefore, the affinity of subsites +2 and +3 was reduced in F318W and V319G, respectively. The reaction with G3 was almost only 1-4 transfer in the wild type, but mainly a 1-6 transfer and even hydrolysis in F318W and V319G. The results suggest that the 1-4 glucosyl transfer requires Gn binding to subsites +2 and +3, otherwise the 1-6 transfer is likely to occur.

glycoside hydrolase family 15, glucosyl transfer reaction, regioselectivity

発表責任者：尾下晴紀（h.oshita@chem.agr.hokudai.ac.jp）

講演番号：4G03-10
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:00～ ミーティングルーム G

スクロースシンターゼへのリン酸結合部位導入によるスクロースリン酸シンターゼ活性の付与

Engineering of sucrose synthase: addition of sucrose phosphate synthase

○川村 大棋、佐分利 亘、森 春英（北大院農）
○Daiki KAWAMURA, Wataru SABURI, Haruhide MORI (Hokkaido Univ.)

背景）スクロースシンターゼ (SS) とスクロースリン酸シンターゼ (SPS) は UDP-Glc のグルコシル転移を触媒し，それぞれスクロース (Suc)，スクロース 6-リン酸 (Suc6*P*)を生成する酵素である．活性の違いは受容体基質の特異性（それぞれ Fru または Fru6*P*）の差異による．両酵素の触媒ドメイン構造は類似しており，基質特異性の差異は基質 Fru 残基の 6 位周辺の構造に起因すると予想される．本研究ではイネ由来 SS アイソザイム 3 (SS3)を用い，これらに該当すると推定されるアミノ酸残基 (E444 および Q467 など) を SPS 型に置換した変異酵素の基質特異性を解析した．

結果と考察）SS3 野生型酵素および E444G，Q467R および E444G/Q467R を含む変異酵素を調製した．Suc 生成速度 (v_{suc}) および Suc6*P* 生成速度 (v_{suc6P}) を測定した．野生型酵素は v_{suc} (37 s^{-1}) に加え，低いながら v_{suc6P} (0.0029 s^{-1}) も示した．変異酵素の v_{suc} は大きく低下した (野生型酵素の 0.0035–9.4%) が，v_{suc6P} は 5.1–270%であった．特に E444G/Q467R では，v_{suc} は野生型酵素の 0.0064%にまで著しく低下したが，v_{suc6P} は 270%へと上昇し，v_{suc6P}/v_{suc} 値は 3.2 であった．すなわち本変異酵素は Fru よりも Fru6*P* に高い特異性を示した．E444G 変異によりリン酸結合のスペースが生じ，Q467R 変異により SPS 様のリン酸結合が導入された事によると考えられた．

Background) Sucrose synthase (SS) and sucrose phosphate synthase (SPS) catalyze the glucosyl transfer from UDP-Glc and produce sucrose (Suc) or sucrose 6-phosphate (Suc6*P*), respectively. The substrate preference between Fru and Fru6*P* discriminates the activities. Because of their catalytic domain structures are similar, the essential structural difference of the enzymes is predicted to lie in the phosphate group-binding site and its equivalent. In this study, some amino acid residues, such as E444 and Q467, of rice SS isozyme 3 (SS3) were replaced by SPS-type residues, and the SS3 mutants were analyzed.

Results and discussion) The wild-type enzyme (WT) and mutant enzymes including E444G, Q467R and E444G/Q467R were prepared. The WT showed a low level of v_{suc6P} (0.0029 s^{-1}) in addition to v_{suc} (37 s^{-1}). In the mutant enzymes, v_{suc} was greatly reduced (0.0035-9.4% of the WT), whereas v_{suc6P} was 5.1-270%. Especially in E444G/Q467R, v_{suc} was markedly reduced to 0.0064% of the WT, but v_{suc6P} increased to 270%, resulting in a v_{suc6P}/v_{suc} value of 3.2. The results suggest that the E444G mutation provided a space for binding to the phosphate group and the introduction of Q467R gave an SPS-like interaction with it.

sucrose synthase, sucrose phosphate synthase, phosphate binding site

発表責任者：川村大棋（dkawamura@chem.agr.hokudai.ac.jp）

講演番号：4G03-11
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:00～ ミーティングルーム G

バクテロイデス由来α-ガラクトシルセラミド合成酵素の同定と解析
Identification and biochemical characterization of the α-galactosylceramide synthase from *Bacteroides fragilis*
○沖野 望、曲 清俊、石橋 洋平、伊東 信（九州大農）
○Nozomu OKINO, Qingjun QU, Yohei ISHIBASHI, Makoto ITO (Kyushu Univ.)

スフィンゴ糖脂質は真核生物に幅広く存在するセラミド骨格を有する一群の糖脂質であるが、原核生物においてはその存在は限定的である。細菌由来のスフィンゴ糖脂質はセラミドに糖がαグリコシド結合で結合すると共に、ナチュラルキラーT 細胞のリガンドとして作用することが知られているが、その合成に関わる糖転移酵素の情報は少ない。私たちは、グルクロノシルセラミド（GlcACer）を有するスフィンゴモナス科細菌 *Zymomonas mobilis* のゲノム中にグルクロノシルジアシルグリセロール合成酵素のホモログとして、GlcACer 合成酵素（ceramide glucuronosyltransferase, Cer-GlcAT）の候補配列を見出し、その配列が Cer-GlcAT であることを明らかにした。一方、腸内細菌の一種である *Bacteroides fragilis* 由来の α-ガラクトシルセラミド（α-GalCer）が宿主の免疫機能を調節することが知られているが、その糖転移酵素に関する情報はない。そこで、*Z. mobilis* 由来 Cer-GlcAT のホモログを *B. fragilis* のゲノムから探索し、大腸菌で発現・精製して酵素活性を測定したところ、当該配列が GalCer 合成酵素（ceramide galactosyltransferase, Cer-GalT）であることが分かった。さらに、Cer-GalT の反応産物である GalCer のアノマー型を HILIC-LC-MS/MS で分析したところ、α-GalCer であることが明らかになった。本研究で同定された α-GalCer 合成酵素は、細菌におけるスフィンゴ糖脂質の機能のみならず、細菌スフィンゴ糖脂質の感染や共生における機能の解明に貢献することが期待される。

Glycosphingolipids (GSLs) are amphipathic compounds, consisting of a hydrophobic ceramide (Cer) portion and hydrophilic sugar moiety, mainly distributed in the plasma membrane of eukaryotic cells. GSLs are ubiquitously found in eukaryotes but are also found in some bacteria mainly belonging to the order Sphingomonadales of α-proteobacteria. Bacterial GSLs such as glucuronosylceramide (GlcACer) and galactosylceramide (GalCer) have been identified as ligands for invariant natural killer T cells and play important roles in host defense. However, the GSL synthases required for production of these ceramides have not been well-characterized. Recently, we have succeeded to identify the GlcACer synthase of *Z. mobilis* and found a homologous sequence in the genome of *B. fragilis*, which has been reported to produce α-GalCer. Here, we report the identification and characterization of α-GalCer synthase of *B. fragilis*. This study contributes to the understanding of the roles of bacterial GSLs in host-bacteria interactions and the function of bacterial GSLs in bacterial physiology.
Reference：Okino N. *et al. J. Biol. Chem.* **295**, 10709-10725 (2020)

α-galactosylceramide, *Bacteroides fragilis*, glycosyltransferase

発表責任者：沖野　望（nokino@agr.kyushu-u.ac.jp）

講演番号：4G03-12
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:00～ ミーティングルーム G

Paenibacillus borealis 由来 3-*O*-β-D-グルコシル-D-グルクロン酸ホスホリラーゼ

3-*O*-β-D-Glucosyl-D-glucuronic acid phosphorylase from *Paenibacillus borealis*

○磯野 直人[1]、水谷 映美[2]、林田 春香[2]、勝崎 裕隆[1] ([1]三重大院生物資源、[2]三重大生物資源)
○Naoto ISONO[1], Emi MIZUTANI[2], Haruka HAYASHIDA[2], Hirotaka KATSUZAKI[1] ([1]Graduate School of Bioresources, Mie University, [2]Faculty of Bioresources, Mie University)

糖質加水分解酵素ファミリー94 (GH94)に属している酵素の多くは β-グリコシド結合を有する糖質を加リン酸分解するホスホリラーゼである. 本研究ではこれまでに機能が明らかにされていない *Paenibacillus borealis* 由来 GH94 タンパク質の性質を調べた.

大腸菌コールドショック発現系を用いてヒスチジンタグが付加されたタンパク質を生産し, ニッケルカラムで精製した. 組換え GH94 タンパク質はホスホリラーゼであり, グルクロン酸をアクセプター, α-グルコース 1-リン酸をドナーとした合成反応を触媒し, 3-*O*-β-D-グルコシル-D-グルクロン酸を生成した. 一方, グルコースやグルコン酸など, 他のアクセプターを基質とした合成反応は観察されなかった. また, 本酵素はラミナリビオースやセロビオン酸を加リン酸分解しなかった. このように, 本酵素はラミナリビオースホスホリラーゼやセロビオン酸ホスホリラーゼとは異なる基質特異性を示した. 3-*O*-β-D-グルコシル-D-グルクロン酸ホスホリラーゼを本酵素の名称として提唱する.

Glycoside hydrolase family 94 contains some β-glycoside phosphorylases. We examined the properties of a GH94 protein from *Paenibacillus borealis* in this study.

A His-tagged protein was produced using the cold-shock expression system and purified by nickel affinity chromatography. We found that the enzyme catalyzes a reverse phosphorolytic reaction using glucuronic acid as an acceptor and α-glucose 1-phosphate as a donor and produces 3-*O*-β-D-glucosyl-D-glucuronic acid. However, the reverse phosphorolytic activity toward other tested carbohydrates as acceptors, including glucose and gluconic acid, was not observed. The enzyme does not degrade laminaribiose and cellobionic acid, indicating that the GH94 enzyme is not laminaribiose phosphorylase or cellobionic acid phosphorylase. We propose 3-*O*-β-D-glucosyl-D-glucuronic acid phosphorylase as the enzyme's name.

Phosphorylase, GH94

発表責任者：磯野直人（isono@bio.mie-u.ac.jp）

講演番号：4G03-13
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:00～ ミーティングルーム G

機能改変β-1,6-グルカナーゼを用いたβ-1,6-グルカンの簡易迅速定量法の開発

Rapid quantification method for ß-1,6-glucan using functionally modified endo-ß-1,6-glucanase

○山中 大輔[1]、中島 大智[1]、木村 将大[1,2,3]、小山 文隆[2]、大野 尚仁[1]、安達 禎之[1]([1]東京薬科大薬、[2]工学院大先進工・生命化学科、[3]日本学術振興会特別研究員(PD))
○ Daisuke YAMANAKA[1], Daichi NAKAJIMA[1], Masahiro KIMURA[1,2,3], Fumitaka OYAMA[2], Naohito OHNO[1], Yoshiyuki ADACHI[1] ([1]Tokyo Univ. Pharm. Life Sci., [2]Kogakuin Univ., [3]PD)

β-グルカンは真菌細胞壁を構成する主要な糖鎖であり，グルコースの連結様式の違いからβ-1,3-グルカン及びβ-1,6-グルカンに分類される。これまでにβ-1,3-グルカンを高感度に検出する方法として，カブトガニの血液凝固系を用いた LAL 法が開発されており，臨床では血中β-1,3-グルカンの測定が深在性真菌症の診断補助法に役立てられている。我々は新たにβ-1,6-グルカンの高感度検出法を開発するため，エンドβ-1,6-グルカナーゼ（EC:3.2.1.75）の糖質分解酵素（Glycoside Hydrolase family 30: GH 30）としての本来の機能を改変し，β-1,6-グルカン結合タンパク質として応用することで高感度 ELISA 法を開発した。本研究ではさらに短時間での測定を実現するため，磁性粒子を用いた高速定量法の構築を試みた。*Neurospora crassa* 由来エンドβ-1,6-グルカナーゼ（Neg1）の誘導体（Neg1-E321Q）をβ-1,6-グルカン結合タンパク質として用い，ストレプトアビジン結合ペプチド（SBP）またはルシフェラーゼ断片（HiBiT）と融合して大腸菌で発現させた。ペプチドタグ融合による糖鎖結合活性への影響を ELISA により評価し，いずれも結合活性を保持していることを確認した。ストレプトアビジンコート磁性粒子と，Neg1-E321Q-SBP 及び Neg1-E321Q-HiBiT を用いた検出方法について検討し，可溶性β-1,6-グルカンを 30 分以内に定量することが可能となった。本測定法では精製多糖のみならず，カンジダ菌が放出する粗精製のβ-1,6-グルカンも同様に測定可能であることが確認された。これらの結果は，β-1,6-グルカナーゼを用いた本測定法が真菌由来β-1,6-グルカンの簡易迅速定量に利用できることを示している。

β-Glucans are main polysaccharides that compose the fungal cell wall and are classified into β-1,3-glucans and β-1,6-glucans based on differences in glycosidic bond. We have developed a β-1,6-glucan-specific detection system using functionally-modified endo-β-1,6-glucanase. In this study, we aimed to construct a rapid-quantitative method using magnetic beads to achieve even faster measurements. An endo-β-1,6-glucanase derivative (Neg1-E321Q) from *Neurospora crassa* was expressed in E. coli as a streptavidin-binding peptide (SBP)-fusion protein or split-luciferase small peptide (HiBiT)-fusion protein. By using streptavidin-magnetic beads, Neg1-E321Q-SBP and Neg1-E321Q-HiBiT could be quantified soluble β-1,6-glucan within 30 minutes. Our results demonstrate that an assay using endo-β-1,6-glucanase can be used for simple and rapid determination of fungal β-1,6-glucans.

β-1,6-glucan, endo-ß-1,6-glucanase, ELISA

発表責任者：山中大輔（ymnkd@toyaku.ac.jp）

講演番号：4G03-14
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:00～ ミーティングルーム G

植物細胞質ペプチド：N-グリカナーゼ（cPNGase）の in vitro での活性測定系の構築
Construction of the assay system for *in vitro* plant cytosolic PNGase activity

○白井 佐保子[1]、上村 亮太[1]、秋山 剛[1]、前田 恵[1]、梶浦 裕之[2]、三崎 亮[2]、藤山 和仁[2]、木村 吉伸[1] ([1]岡山大院・環境生命、[2]大阪大・生物工学国際交流センター)
○ Sahoko SHIRAI[1], Ryota UEMURA[1], Tsuyoshi AKIYAMA[1], Megumi MAEDA[1], Hiroyuki KAJIURA[2], Ryou MISAKI[2], Kazuhito FUJIYAMA[2], Yoshinobu KIMURA[1] ([1]Graduate school of Environmental and Life science. Okayama Univ., [2]International center for Biotechnology. Osaka Univ.)

真核生物に遍在する細胞質ペプチド：*N*-グリカナーゼ（cPNGase）は，脱グリコシル化反応を触媒し，ミスフォールド糖タンパク質から糖鎖を遊離させる。植物 cPNGase は， *Arabidopsis thaliana* の遺伝子を PNGase 欠損酵母で発現させることにより，ミスフォールド糖タンパク質の脱グリコシル化に関与することが示されている[1, 2]。
しかしながら，*in vitro* における植物 cPNGase の脱グリコシル化活性を直接報告した例はない。本研究では，還元 *S*-カルボキシメチル化糖タンパク質を基質とし，*A. thaliana* 酸性 PNGase 欠損株の粗酵素液を用いた *in vitro* の cPNGase 活性測定法を確立したので報告する。

Cytosolic peptide: *N*-glycanase (cPNGase), which is ubiquitous in eukaryotes, catalyzes a deglycosylation reaction and releases free *N*-glycans from misfolded glycoproteins. It has been confirmed that plant cPNGase is involved in deglycosylation of misfolded glycoproteins by the transformation of *A. thaliana* cPNGase gene into a mutant yeast strain lacking its own PNGase activity [1, 2]. However, cPNGase activity has not been directly detected *in vitro* to date. In this study, we report the successful construction of the assay system for *in vitro* cPNGase activity using the reduced Reduced and *S*-carboxy-methylated glycoprotein as a substrate and the crude enzyme solution from aPNGase knockout *A. thaliana*.

[1] A. Diepold, G. Li, W.J. Lennarz, T. Nürnberger and F. Brunner., Plant J., 52, 94-104 (2007).
[2] Y. Masahara-Negishi, A. Hosomi, M.D. Mea, D. Serafini-Fracassini and T. Suzuki., Biochim. Biphys. Acta, 1820, 1457-1462 (2012).

cytosolic PNGase, free N-glycan, ERAD

発表責任者：白井佐保子（p3p549lf@s.okayama-u.ac.jp）

講演番号：4G03-15
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:00～ ミーティングルーム G

ヒトとマウスキトトリオシダーゼのアミノ酸 218 位の置換による活性の評価
Evaluation of activity of human and mouse chitotriosidase by substitution of amino acid 218th
○木村 将大[1,2,3]、渡邊 尭[1]、関根 一孝[1]、石塚 ひとみ[1]、池尻 碧[1]、坂口 政吉[1]、山中 大輔[3]、小山 文隆[1] ([1]工学院大先進工、[2]日本学術振興会特別研究員(PD)、[3]東京薬科大薬)
○Masahiro KIMURA[1,2,3], Takashi Watanabe[1], Kazutaka Sekine[1], Hitomi Ishizuka[1], Aoi Ikejiri[1], Masayoshi Sakaguchi[1], Daisuke Yamanaka[3], Fumitaka Oyama[1] ([1]Department of Chemistry and Life Science, Kogakuin University, Hachioji, Tokyo 192-0015, Japan, [2]Research Fellow of Japan Society for the Promotion of Science (PD), Koujimachi, Chiyoda-ku, Tokyo 102-0083, Japan, [3]Laboratory for Immunopharmacology of Microbial Products, School of Pharmacy, Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences, Hachioji, Tokyo 192-0392, Japan)

キチンは，*N*-acetyl-D-glucosamine (GlcNAc) が β-1, 4 結合した重合体である。キチンは寄生虫や真菌，昆虫や甲殻類の外骨格等を構成する物質であるため，セルロースに次いで豊富に存在するバイオマスである。キチナーゼ (EC 3.2.1.14) は，キチンを加水分解する酵素であり，ほ乳類は，活性を持つキチナーゼとして chitotriosidase (Chit1) と acidic mammalian chitinase (AMCase) を発現する。ゴーシェ病は，グルコセレブロシダーゼ (glucocerebrosidase, GBA) の欠損であることが知られており，その補充療法は有効な治療法の一つである。Chit1 は，常染色体劣性のリソソーム蓄積症であるゴーシェ病患者の血漿中で，約 1,000 倍上昇し，現在，Chit1 活性は，ゴーシェ病患者の GBA 補充療法のバイオマーカーとして用いられている。Chit1 は様々な炎症性疾患と関連が示唆されているが，これらの疾患や病態における病態生理学的な役割は不明な点が多い。これまで，ヒトとマウスの Chit1 の遺伝子レベルでの研究は行われていたが，両酵素の機能を直接比較した研究はないため，本研究では，ヒトとマウス Chit1 タンパク質を大腸菌で発現し，それらのキチナーゼ活性と糖転移活性を比較した。キチナーゼ活性は人工基質 4-nitrophenyl *N, N'*-diacetyl-β-D-chitobioside [4-NP-$(GlcNAc)_2$] を用いて 37℃ 各 pH で測定した。ヒト Chit1 はマウスよりも約 2 倍ほど高いキチナーゼ活性を示した。糖転移活性は 4-NP-$(GlcNAc)_2$ および 4-methylumbelliferyl *N*-acetyl-β-D-glucosaminide [4-MU-GlcNAc] を同時添加することで評価した。さらに，分解産物は Fluorophore-Assisted Carbohydrate Electrophoresis (FACE) 法で検出した。その結果，ヒト Chit1 はマウスよりも顕著に高い糖転移活性を示した。このようにヒトとマウスの Chit1 の触媒活性には差があった。その原因アミノ酸を探るため、ほ乳類の Chit1 のアミノ酸配列を比較したところ，218 番目のアミノ酸の変異がマウス酵素にのみ生じたことが示唆された。そのため，ヒトとマウスの Chit1 の 218 番目の互いのアミノ酸を置換したところ，それぞれの活性が変化した。これらの結果から，218 残基のアミノ酸が Chit1 のキチナーゼ活性と糖転移活性を調節していることが示唆された。

Chitin is a β-1, 4-bonded polymer of N-acetyl-D-glucosamine (GlcNAc). Mammals express chitotriosidase (Chit1) and acidic mammalian chitinase (AMCase) as active chitinases. We compared the chitinase activity and transglycosylation activity of human and mouse Chit1. Human Chit1 showed higher activity than those of mouse enzyme. Substitutions of the 218th amino acid in both Chit1 each other resulted in changes in their activities. These results suggest that W218 regulate the chitinase and transglycosylation activities of human Chit1.

Amino acid substitution, Chitotriosidase, Mammalian

発表責任者：木村　将大（mkimura@toyaku.ac.jp）

講演番号：4G03-16
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:00～ ミーティングルーム G

CRISPR/Cas9 システムによる ENGase 欠損トマトの構築
Construction of deletion mutants of ENGase in tomato using the CRISPR/Cas9 system

○前田 恵[1]、山本 千晴[1]、篠崎 良仁[2,3]、杉本 貢一[2]、江面 浩[2]、木村 吉伸[1] ([1]岡山大院・環境生命、[2]筑波大・つくば機能植物イノベーション研究センター、[3]東京農工大・グローバルイノベーション研究院)
○ Megumi MAEDA[1], Chihiro YAMAMOTO[1], Yoshihito SHINOZAKI[2,3], Koichi SUGIMOTO[2], Hiroshi EZURA[2], Yoshinobu KIMURA[1] ([1]Graduate School of Environmental and Life Science, Okayama Univ., [2]Tsukuba Univ., [3]Tokyo University of Agriculture and Technology)

分化・生長中の植物細胞ではエンド-β-*N*-アセチルグルコサミニダーゼ (ENGase) の作用により生成した還元末端に *N*-アセチルグルコサミンを 1 残基有するハイマンノース型の遊離 *N*-グリカン(HMT-FNGs)が存在している。HMT-FNGs の植物における生理機能を解明する研究の一環として，トマト ENGase 遺伝子の同定および果実成熟に伴う HMT-FNGs 量の増加を報告している[1,2]。本研究では ENGase 欠損トマトをゲノム編集で構築し，HMT-FNGs の果実成熟への関与について明らかにすることを目的とした。トマト ENGase 遺伝子を標的としたガイド RNA 配列は，CRISPR/Cas9 発現ベクターと連結させた。得られたプラスミドはアグロバクテリウム EHA105 株に導入し，トマト子葉切片に感染させて形質転換を行った。カナマイシン耐性のカルスを選抜し，シュートが発生し発根した個体を T0 世代として得た。ゲノム DNA シーケンスの結果，標的部位では 84 塩基の欠損が確認され，ENGase 遺伝子産物が発現しないゲノム編集体を得る事に成功した。T0 世代を播種して得られた T1 世代からは，ゲノム編集体かつ T-DNA を喪失したヌルセグリガント 3 株を得る事が出来た。そこでそれらの葉を用いて，ENGase の活性測定を行ったところ，いずれも ENGase 活性を消失していることが確認できた。更に，ENGase により生成する HMT-FNGs を葉の抽出物の透析外液からイオン交換，ゲルろ過，蛍光ラベル，Con A アフィニティクロマトグラフィーにより精製し，RP/SF-HPLC により構造解析を行った。

Endo-β-*N*-acetylglucosaminidase produce high mannose type free N-glycans having one GlcNAc residue at the reducing end (HMT-FNGs). HMT-FNGs occur in plant cells during differentiation and growth, and in fruits during ripening. In order to elucidate the physiological functions of the HMT-FNGs, we constructed a deletion mutant of ENGase in tomato by the genome editing with the system of CRISPR/Cas9. The mutant line showed no ENGase activities. The structural features of HMT-FNGs will be discussed.

[1] *Biosci Biotechnol Biochem.*, 72, 2936-45 (2008)
[2] *Biosci Biotechnol Biochem.*, 73, 461-4 (2009)

free *N*-glycan, ENGase, fruits maturation

発表責任者：前田　恵（mmaeda@okayama-u.ac.jp）

講演番号：4G03-17
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:00～ ミーティングルーム G

サツマイモ由来粗酵素による効率的なテアフラビン合成

Efficient synthesis of theaflavins by crude enzyme extracted from sweet potato

○廣實 咲紀、智田 遼、松田 寛子、奈良井 朝子（日獣医大応生科）
○Saki Hirozane, Haruka Chida, Hiroko Matsuda, Asako Narai (Nippon Veterinary and Life Science Univ.)

紅茶の赤橙色色素であるテアフラビン（TF）類は、紅茶製造中の発酵工程で茶葉中のカテキン類が茶葉由来のポリフェノールオキシダーゼ（PPO）によって酸化的に縮合した二量体である。選択的なカテキンの組み合わせ（カテコール型のエピカテキンまたはそのガレート（EC, ECg）とピロガロール型のエピガロカテキンまたはそのガレート（EGC, EGCg)）から 4 種類の TF（galloyl 基のない TF1, monogallate の TF2A と TF2B, digallate の TF3）が生成され、様々な生理機能を有することが報告されている。しかし、紅茶葉から抽出精製される TF 類の量は少なく、作用機構や構造活性相関などの研究の進展が妨げられている。一方、PPO は植物に広く存在し、農産物の調理加工においては酵素的褐変の原因酵素として知られている。そこで演者らは、TF の効率的且つ大量合成に適した農産物由来の PPO の探索をおこない、サツマイモが TF 合成に適した酵素資源であることを見出した。

サツマイモからアセトン沈殿法または硫安塩析法のそれぞれで粗酵素を抽出し、カテキンを含む緑茶浸出液と混合して分光学的に TF 合成活性を測定したところ、タンパク質回収量、TF 合成活性ともに硫安塩析法で抽出した粗酵素が高い値を示した。次に、この粗酵素を選択したカテキン 2 種類の混合液に添加して 4 種類の TF を合成し、RP-HPLC で分析した結果、TF 類の生成量は TF1＞TF2B＞TF2A＞TF3 となった。さらに、単独のカテキン類に粗酵素を作用させて速度論的解析をおこなったところ、カテコール型カテキン、特に EC に対して高い反応性を示し、ピロガロール型カテキンにはほとんど作用しなかった。したがって、サツマイモ粗酵素は EC または ECg の酸化反応を優先的に触媒し、その酸化生成物であるキノンと EGC または EGCg が酸化的に縮合して TF 類を生成することが示唆された。緑茶浸出液をカテキン供給源として本粗酵素と反応させ、TF 類を効率的に合成するための条件を検討した結果も発表する。

In this study, we found that the crude enzyme extracted from tuberous roots of sweet potato (*Ipomoea batatas*) can be used for the synthetic reaction of theaflavins from green tea catechins. Kinetic analysis suggested that polyphenol oxidase (PPO) contained in the crude enzyme highly reacts with (-)-epicatechin (EC) and its gallate, leading to the oxidative condensation between these catechins and (-)-epigallocatechin (EGC) and its gallate. Among four types of theaflavins, TF1, TF2A, TF2B, and TF3, the highest yield was observed in TF1.

theaflavin, sweet potato, polyphenol oxidase

発表責任者：奈良井朝子（a-narai@nvlu.ac.jp）

講演番号：4H02-01
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:30～ ミーティングルーム H

加硫ゴムから炭酸カルシウムを除去するキノコの作用

Fungal behavior for removal of calcium carbonate from vulcanized solid rubber

○佐藤 伸、稲森 渉、ホアンキム ティエン (公立鳥取環境大学)
○Shin Sato, Wataru Inamori, Tien Hoan Kim (Tottori University of Environmental Studies)

我々はこれまでに，加硫天然ゴムシートの分解を引き起こす木材腐朽菌 *Trichaptum* 属の 2 種を自然界から分離することに成功し、その加硫ゴム分解メカニズムの解析と，菌の作用を加硫ゴムの再資源化に応用する技術展開について検討を行ってきた。その中で、我々が分離したキノコは加硫ゴムのゴム成分よりも充填剤として添加されている炭酸カルシウムを除去し、物性の大きな低下を引き起こしていることが明らかとなった。この内容について報告する。

実験では，厚さ 1mm のシート状の天然ゴムおよび合成ゴムをブナ・ふすま培地に置き，*T. abietinum* TUES-23，もしくは *T. biforme* TUES-16 を植菌して静置培養下，25℃で 3～9 ヶ月間処理を行った。菌処理後，ゴムシートの表面形態，物性，架橋密度，成分と化学結合の変化をそれぞれ分析した。

その結果，2 つの木材腐朽菌はともに，加硫した天然，および合成ゴムシートの表面の粗化を引き起こし，架橋密度を変化させ，引張強度を著しく低下させた。熱重量分析の結果から，2 つの菌による重量減少の大部分は，ゴムのポリマー成分よりも，充填剤として添加されている炭酸カルシウムが脱離したためと推定された。菌による加硫ゴム中の脱炭酸カルシウムは，ゴム表層だけでなくゴムの内部でもみられ，培養 3 ヶ月間で *T. abietinum* では深さ 0.2 mm， *T. biforme* では深さ 1 mm まで除去されていることが X 線 CT 分析から明らかとなった。

このようなキノコによるゴム充填剤の除去作用は，廃ゴムのマテリアルリサイクルに有利に働くことが予想される。キノコの作用による廃ゴム再資源化の実現に向けて，現在ゴムに作用するキノコの菌体外酵素群の解析を進めている。

In our previous study, wood rotting fungi, two species of *Trichaptum* genera capable of vulcanized solid rubber have been isolated in nature. Then, analysis of fungal degradation mechanisms of rubber vulcanizates and the application to rubber recycle have been conducted. In this study, we report that the rubber degrading fungi are able to remove calcium carbonate as a filler from vulcanized rubber, causing significant decrease of physical strength of the rubber. Our study is in progress to clear the fungal mechanism associated with extracellular enzymes.

rubber-degrading fungi, vulcanized rubber, calcium carbonate

発表責任者：佐藤　伸（s-sato@kankyo-u.ac.jp）

講演番号：4H02-02
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:30～ ミーティングルーム H

炭酸ガス発生量と強熱減量による好気性高温堆肥を用いたポリ乳酸分解率の解析

Analyses of polylactic acid polymers decomposition rate using aerobic high temperature compost by carbon dioxide generation and ignition loss

○添田 紗也加、吉井 貴宏、森屋 利幸、大島 泰郎（共和化工・環境微生物研）
○Sayaka SOEDA, Takahiro YOSHII, Toshiyuki MORIYA, Tairo OSHIMA (Inst. of Environ. Microbiol., Kyowa Kako Co., Ltd)

堆肥化は生ゴミや下水汚泥、家畜糞尿などの有機性廃棄物を肥料として再利用する技術として古くから用いられている。一方、生分解性プラスチックは堆肥化が可能であるが、従来のプラスチックと同様に焼却などで処理されており、資源循環の観点では生分解性プラスチックの堆肥化処理を促進することが望ましい。生分解性プラスチックのポリ乳酸（PLA）は自然環境下では分解が遅く、分解過程において 50℃以上の熱を必要とすることから、我々は鹿児島県の株式会社山有が開発した発酵温度が 90℃以上に達する好気性高温堆肥発酵に着目し、本堆肥化処理による PLA の迅速な分解について検討している。*Calditerricola* 属などの高度好熱菌は下水汚泥由来堆肥から分離されている [1)] が、本堆肥における PLA 分解微生物や分解酵素に関する知見は少ない。ラボレベルでは炭酸ガス発生量を測定することによって PLA 分解率を追うことができたが、処理場レベルでは実際に分解しているのか確認ができていなかった。本研究では PLA が処理場レベルでも分解できているのかを確認するため、強熱減量の測定により分解率を追うことができるか調べた。

ラボ試験では、約 3 週間でほとんどの PLA が分解された。炭酸ガス発生量と強熱減量からそれぞれ算出した分解率が強い相関を示したことから、強熱減量でも分解の様子を追えるか検討した。処理場試験では、試験区にて約 8%高かった強熱減量が、約 5 週間で対照区と同じくらいまでに減少した。ラボ試験よりも時間はかかるものの、処理場でも分解できていることが示唆された。発酵過程の微生物叢を対照区と比較することで、PLA 分解微生物を考察する。

Composting has been used to decompose organic waste and to make fertilizer. Although biodegradable plastics can be composted, in reality they are incinerated. Polylactic acid (PLA) requires heating at 50 ºC or higher to biodegrade. Therefore, we focused on aerobic high temperature compost and investigated the decomposition of PLA. In laboratory, we could prove the decomposition of PLA by measurement of the amount of CO_2 generation using an airtight container and the compost soil. However, to measure the amount of CO_2 generation from the compost pile is so difficult that we could not prove that PLA is really decomposed. In this study, in order to prove whether PLA can be decomposed even in the compost pile, it was investigated whether the decomposition rate can be traced by measuring of ignition loss (IL). Since the decomposition rates calculated from the amount of CO_2 generated and the IL showed a strong correlation, it was considered that the decomposition rate could be followed even by measuring the IL.

1) Moriya, T. et al. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 61: 631~6.

polylactic acid, compost, ignition loss

講演番号：4H02-03
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:30～ ミーティングルーム H

固体腐植物質による生物学的二酸化炭素資源化反応の促進

Promotion of biological CO_2 fixation by solid-phase humic subsutances

○笠井 拓哉、ラスカー マハシュウェタ、片山 新太 (名大未来研)
○Takuya KASAI, Mahasweta LASKAR, Arata KATAYAMA (Nagoya Univ.)

独立栄養酢酸生成細菌（酢酸生成細菌）は二酸化炭素を還元して酢酸を生成することができることから、生物学的二酸化炭素固定化技術への応用に期待されている。一方で、酢酸生成細菌による二酸化炭素固定反応を行うためには、水素やギ酸などの還元力を酢酸生成細菌へ供給し続ける必要がある。

ヒューミンは如何なる pH にも不溶な腐植物質あり、土壌や底質など幅広い環境中に存在する。近年の研究より、ヒューミンは電子伝達物質と機能することが明らかになり、様々な微生物の還元反応（ペンタクロロフェノールの脱塩素反応や脱窒反応など）を促進することが示された。そこで我々は、ヒューミンが酢酸生成細菌の二酸化炭素固定反応へ影響を与える可能性ついて考え、検証を行った。

炭素源を二酸化炭素/炭酸イオンとしたヒューミン混合培地を用いて、酢酸生成細菌群集の集積培養を行い、得られた微生物群集による酢酸蓄積量をヒューミンの有無で比較したところ、ヒューミン混合条件でのみ酢酸の蓄積が見られた。さらに、酢酸生成細菌群集構造解析を行ったところ、主に *Clostridiales* 目に属する酢酸生成細菌の割合がヒューミン存在下で高くなることが明らかになった。

Chemoautotrophic acetogen is capable of reducing carbon dioxide (CO_2) to acetate. It plays an important role in the fixation of atmospheric CO_2 as greenhouse gas and, therefore, carbon cycle in nature. But, the CO_2 fixation by acetogen requires the supply of reducing power such as hydrogen and formate.

Humin, which is insoluble humic substances at any pH conditions, exists in various environments such as soil and sediment. Our previous studies demonstrated that humin functions as an electron mediator and can promote several bacterial reducing metabolisms (e.g. anaerobic dechlorination, denitrification, and etc). Here, we examined whether humin can donate electrons to acetogen and promote microbial CO_2 reduction to acetate.

Humin-dependent acetogenic consortium was obtained by enrichment of the culture with humin under autotrophic conditions. The effect of humin on the acetogenesis was evaluated based on the acetate concentration in the consortium with/without humin after 15 days of the incubation. The acetate concentration in the consortium with humin was higher (0.24 mM), compared with less than 0.03 mM of acetate in the consortium without humin. The analysis of microbial community structure suggested *Lachnospiraceae* and *Ruminococcaceae* in *Clostridiales* as major CO_2-reducing acetogens of this humin-dependent consortium.

Solid-phase humin, CO_2 fixation, Chemoautotrophic acetogen

講演番号：4H02-04
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:30～ ミーティングルーム H

L-アミノ酸オキシダーゼ細胞表層提示酵母による食品加工廃棄物からの高効率なアンモニア生産

Effective ammonia production from food processing wastes by cell surface displayed L-amino acid oxidase on yeast

○渡邉 幸夫[1]、青木 航[1,2]、植田 充美[1,2] ([1]京大院農、[2]JST-CREST)
○Yukio WATANABE[1], Wataru AOKI[1,2], Mitsuyoshi UEDA[1,2] ([1]Kyoto Univ., [2]JST-CREST)

[Background]

A sustainable society is essential for future generations. Ammonia plays important roles in the agriculture and chemical industry. Development of a novel methodology for sustainable production of ammonia is an urgent priority. In our previous study, we showed that cell surface engineered yeast was able to efficiently produce ammonia from glutamine in soybean residues (okara), as a food processing waste [1]. In this study, we tried to improve the yield of ammonia production and planned to display an L-amino acid oxidase with wide substrate specificities derived from fungi, *Hebeloma cylindrosporum* (HcLAAO), on the yeast cell surface.

[Methods]

A codon-optimized *HcLAAO* gene was synthesized and inserted into a cassette vector for yeast cell surface display [2]. The plasmid vector was introduced into yeast and the cell surface display of HcLAAO was confirmed by immunofluorescence labeling. The HcLAAO-displaying yeast was incubated with amino acid mixture solution or soybean residues (okara), and the amount of produced ammonia is quantified.

[Results & Discussion]

We found that the HcLAAO displaying yeast produced 12.6 mM of ammonia from 20 amino acids (63.0% conversion rate). Next, using the HcLAAO displaying yeast, we also succeeded in producing ammonia from soybean residues (okara) (88.1% conversion rate), achieving the highest yield compared to previous studies [3]. Our study demonstrated that ammonia production outside cells by displaying L-amino acid oxidase is a promising strategy as a food and agricultural technology for a sustainable society.

References:

[1] Watanabe et al., AMB Express 10(70), 2020
[2] Kuroda et al., Appl Microbiol Biotechnol 82(4), 2009
[3] Watanabe et al., submitted

Ammonia production, L-Amino acid oxidase, Cell surface engineering

講演番号：4H02-05
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:30～ ミーティングルーム H

アセトニトリルおよび塩化ナトリウムを用いた三成分系における 5-hydroxymethylfurfural の生成反応とその速度解析

Kinetic analysis for the production of 5-hydroxymethylfurfural in a three-component mixture of acetonitrile and sodium chloride

○古城 侑也、尾西 佑一朗、谷 史人、小林 敬（京都大院農）
○Yuya Furushiro, Yuichirou Onishi, Fumito Tani, Takashi Kobayashi (Kyoto Univ.)

5-ヒドロキシメチルフルフラール（以下 HMF）は、バイオマス処理により得られ、燃料やポリマーに応用が可能な有用物質である。本研究では、水とアセトニトリル、塩化ナトリウムの三成分を用いて、一相系および二相系におけるフルクトースから HMF への変換反応の速度解析を行った。

1%(w/w)のフルクトース、0~60%(w/w)のアセトニトリル、0~4%(w/w)の塩化ナトリウム、0.1%(w/w)の *p*-トルエンスルホン酸、および水を混合して原料液を調製し、PEEK 製流通式反応器に通液し、140～170℃で反応させた。いくつかの滞留時間（30~120 s）を設定し、得られた反応液のフルクトースおよび HMF の濃度を HPLC にて定量した。

アセトニトリルおよび NaCl の濃度を上昇させると、フルクトースの分解及び HMF の生成が促進された。またアセトニトリルおよび NaCl がともに高濃度で存在する場合には、いずれかのみが高濃度で存在する場合よりも反応が促進され、両者が相乗的に HMF の生成を促進している可能性が示唆された。また反応温度 150℃で、フルクトースの分解反応を速度解析した。その結果、一次反応で良好に反応挙動を表現できた。

5-Hydroxymethylfurfural (HMF) is a useful substance obtained from biomass and applicable to fuels and polymers. In this study, we analyzed the rate of fructose-to-HMF conversion in one-phase or two-phase systems using three components of water, acetonitrile, and sodium chloride.

The mixture of 1% (w/w) fructose, 0–60% (w/w) acetonitrile, 0–4% (w/w) sodium chloride, 0.1% (w/w) *p*-toluenesulfonic acid, and water was used to prepare a raw material solution, which was passed through a PEEK flow reactor and reacted at 140 to 170°C. Several residence times (30–120 s) were set, and the fructose and HMF concentrations in the resulting reaction mixture were quantified by HPLC.

Increasing the concentrations of acetonitrile and NaCl promoted the decomposition of fructose and the production of HMF. In addition, when both acetonitrile and NaCl were present at high concentrations, the reaction was promoted more than when only one component was present at high concentration. These results suggest that both may synergistically promote the production of HMF. The rate of fructose decomposition was analyzed at a reaction temperature of 150°C. As a result, the reaction behavior could be expressed well by the first-order kinetics.

HMF, biphasic system, subcritical water

発表責任者：小林敬（kobayashi.takashi.6w@kyoto-u.ac.jp）

講演番号：4H02-06
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:30～ ミーティングルーム H

マイクロ波を用いる木質バイオマスの精密酸化分解と有用芳香族化合物の合成

Microwave-Assisted Woody Biomass Conversion for the Production of Useful Aromatic Compounds

○山本 敦士[2,3]、磯部 海志[4]、小坂 優太[4]、樫村 京一郎[5]、藤井 隆司[5]、間瀬 暢之[4]、高谷 光[1,2,3]([1]分子科学研究所特別研究部門/光科学第三、[2]京都大学大学院工学研究科物質エネルギー化学専攻、[3]京都大学化学研究所、[4]静岡大学工学部化学バイオ工学科、[5]中部大学工学部共通教育科)
○Atsushi YAMAMOTO[2,3], Kaishi ISOBE[4], Yuta KOSAKA[4], Keiichiro KASHIMURA[5], Takashi FUJII[5], Nobuyuki MASE[4], Hikaru TAKAYA[1,2,3] ([1]Institute for Molecular Science, Division of Advanced Molecular Science/Photo-Molecular Science III, [2]Kyoto University, Graduate School of Engineering, Energy and Hydrocarbon Chemistry, [3]Kyoto University, Institute for Chemical Research, [4]Shizuoka University, Faculty of Engineering, Department of Applied Chemistry and Biochemical Engineering, [5]Chubu University, College of Engineering, General Education)

【背景・目的】リグニンは自然界で最大の資源量を有する芳香族性高分子である。これを酸化・分解することで反応性・機能性に富む，官能基化度の高い芳香族化合物が得られる。我々はリグニンの精密分解によるフェノール類製造反応の開発に取組んできた。その結果，酸化鉄を触媒としてマイクロ波照射下でリグニンの分解反応を行うと，フェノール性の芳香族ケトンである Hibbert ケトンが得られることを見出した[1)]。本講演では，マイクロ波発振器をマグネトロン型から半導体型に変更することでコヒーレンスの高いマイクロ波による低温・短時間での酸化的リグニン分解を比較検討した。
【方法・結果】2.45 GHz 半導体発振器で得られたマイクロ波の電界を円筒型共振器で精密に制御・重ね合わせることで，加熱に用いるマイクロ波の電界強度を増幅した。ウィレーミルで粉砕したユーカリ木粉を原料として用い，各種金属塩/金属酸化物触媒（20 mol%）の存在下に分子状酸素（1 atm）を酸化剤として 60-120 °C，30 分で酸化反応を行ったところ，木粉中リグニンの分解反応が進行して，Hibbert ケトン（1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)propane-1,2-dione, 1-(4-hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl) propane-1,2-dione）及びフェノール類(1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)propan-2-one, 1-(4-hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl)propan-2-one）が得られた。

Development of effective refining process for lignin valorization has been intensively researched to produce renewable aromatic chemicals. We succeeded to develop a microwave-assisted process for Hibbert ketones production based on direct oxidative depolymerization of lignin in wood-mills by using a magnetron-based reactor with use of iron oxide (Fe_2O_3) catalyst and molecular oxygen.[1] Recently, we found that a microwave reactor composed of semiconductor generator and cylindrical cavity resonator, which gives high-coherent microwave, is highly effective for the direct depolymerization of lignin. Under the irradiation of an electric field-separated 2.45 GHz microwave, oxidative decomposition of lignin in Willey-milled eucalyptus was completed within 30 min at 60-120 °C, which is lower compared to the reaction using magnetron-based reactor, to afford the corresponding Hibbert ketones such as 1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl) propane-1,2-dione and 1-(4-hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl)propane-1,2-dione and phenols such as 1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)propan-2-one and 1-(4-hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl)propan-2-one. Comparison of varying microwave conditions, electric/magnetic fields and effect of microwave power and frequency will be discussed.

1) **特開** 2017-145244

Woody biomass, Lignin, Microwave

発表責任者：山本　敦士（yamamoto.atsushi.53x@st.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：4H02-07
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:30～ ミーティングルーム H

実験進化系で得られた人工殺虫剤分解に関与する進化型ハロアルカンデハロゲナーゼ

Evolved haloalkane dehalogenases for the degradation of a man-made pesticide obtained by the experimental evolution system

陳 楠楠、大坪 嘉行、○永田 裕二（東北大生命科）
Nannan Chen, Yoshiyuki Ohtsubo, ○Yuji Nagata (Tohoku Univ.)

ハロアルカンデハロゲナーゼ (HLD) は様々なハロゲン化合物をシンプルな加水分解反応でアルコールに変換する酵素であり、様々な細菌株から様々な HLD あるいはそのホモログが見出されている。HLD は、一般に基質特異性が広く、少ない変異で容易に反応特性を変化させることから、新たな生体触媒開発のための素材として期待されている。我々は、深刻な環境汚染を引き起こしている人工殺虫剤γ-hexachlorocyclohexane (γ-HCH) 資化に適した HLDs の実験進化系を構築した。本系では、error-prone PCR により様々な HLD 遺伝子にランダム変異を導入して構築した変異型 HLD 遺伝子ライブラリーをγ-HCH 資化に関与する HLD である LinB 遺伝子を欠失させたγ-HCH 分解細菌株に導入し、γ-HCH を唯一の炭素源とする無機塩培地で良好に生育するクローンを選択する。本系で得られたクローンが有する推定進化型 HLD は、実際に、それぞれの先祖型 HLD より強い LinB 様活性を示した。さらに、先祖型 HLD に比べて dead-end 産物の産生量が少ない進化型 HLD が得られた。これらの結果は、本実験進化系が良好に機能し、本系を用いて HLD のγ-HCH 資化に対する進化過程を追跡可能であることを示している。

Haloalkane dehalogenases (HLDs) convert various halogenated compounds to corresponding alcohols by simple hydrolytic mechanism, and various HLDs or their homologues have been found in various bacterial strains. Such potential HLDs are promising materials for the development of new biocatalysts, since HLDs generally have a broad range of substrate specificities and ready to change their activities towards various substrates. We have constructed the experimental evolution system of HLDs toward the optimized γ-hexachlorocyclohexane (γ-HCH) utilization. γ-HCH is a man-made pesticide which has caused serious environmental problems. In the system, mutant libraries of various HLD genes constructed by using error-prone PCR were introduced into the γ-HCH degrading bacterial strain whose HLD gene (*linB*) for the utilization of γ-HCH was deleted, and clones were selected that grew well on minimal salt medium containing γ-HCH as a sole carbon source. The putative evolved HLDs indeed showed higher LinB-like activity than their ancestral enzymes. In addition, evolved HLDs that produce smaller amount of dead-end product were obtained. These results indicate that our experimental evolution system worked well and can be used for tracing the evolutionary process of HLDs toward the optimized γ-HCH utilization.

experimental evolution, haloalkane dehalogenase, environmental pollutants

発表責任者：永田裕二（aynaga@ige.tohoku.ac.jp）

講演番号：4H02-08
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:30～ ミーティングルーム H

Characterization of novel 1,4-dioxane-degrading bacteria isolated from a stable 1,4-dioxane-degrading microbial consortium

○Tanmoy Roy Tusher, Takuya Shimizu, Mei-Fang Chien, Chihiro Inoue (Graduate School of Environmental Studies, Tohoku University)

1,4-dioxane (1,4-D), a highly stable synthetic chemical and probable human carcinogen, has been appeared as a water contaminant of emerging concern. Bioremediation of 1,4-D has been receiving substantial attention not only because of it is cost-effective, energy-efficient, and eco-friendly but also owing to its potentiality to be applied in the complex natural environments where co-contamination of other pollutants is commonly occurred. In this regard, we have developed a highly efficient and robust 1,4-D-degrading microbial consortium, named N112, consisting of more than 10 diverse and stably co-existing bacteria. This study was, therefore, aimed to isolate and characterize the 1,4-D-degrading bacteria from the consortium N112. Three 1,4-D-degrading bacteria were isolated by spreading the culture of N112 on mineral salt medium agar plates supplemented with 100 mg/L of 1,4-D. The isolates which can degrade 1,4-D as a sole carbon and energy source were phylogenetically identified as *Pseudonocardia* (strain TS28), *Dokdonella* (strain TS32), and *Bradyrhizobium* (strain TS43). These results gave the first report that *Dokdonella* and *Bradyrhizobium* are involved in 1,4-D degradation. The biodegradation abilities, enzyme inducibility, functional genes, and substrate range of these isolates were further examined. The biodegradation experiments exhibited that all the isolated strains can completely degrade 1,4-D and possess inducible 1,4-D-degrading enzymes. The results of PCR revealed that all 3 isolates contained soluble di-iron monooxygenases (SDIMOs) genes, a family of bacterial multicomponent enzymes catalyzing the 1,4-D degradation. Besides, the SDIMOs genes were also found to be localized in plasmids. Additionally, the isolated strains showed broad substrate range and were found to be capable of utilizing various substrates including easy-to-degrade compounds (glucose and lactic acid), 1,4-D biodegradation intermediates (ethylene glycol), structural analog of 1,4-D (tetrahydrofuran), and other recalcitrant organic compounds co-occurred in 1,4-D contaminated wastewater (e.g. phenol). The results demonstrated that these isolated strains have potential to remove 1,4-D from the contaminated environments, while further studies to understand how these 1,4-D-degraders co-exist stably and interact in consortium N112 relying on a single carbon source (1,4-D) will be helpful when apply the isolates or consortium in practical bioremediation.

1,4-dioxane, bioremediation, SDIMOs

発表責任者：Mei-Fang Chien（meifangchien@tohoku.ac.jp）

講演番号：4H02-09
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:30～ ミーティングルーム H

Isolation and characterization of 3-chlorobenzoate degrading bacteria from soils in Shizuoka

○ARA IFAT, Naoto Ogawa, Kazuhide Kimbara, Masaki Shintani (Shizuoka University)

The Chlorinated aromatic compounds are highly persistent in the environment and causes environmental pollution. The degradation of chlorinated aromatic compounds can be catabolized by bacteria which contain aromatic ring hydroxylating enzymes, dioxygenases. In this study, 22 bacterial strain were isolated as 3-chlorobenzoate (3-CBA) degraders from soils around Shizuoka city by enrichment culture using salt medium with 3-CBA as sole source of carbon and energy. Identification of 14 isolates were performed based on the 16S rRNA gene sequences. They were Gram negative, and belonged to six genera *Caballeronia, Cupriavidus*, *Paraburkholderia*, *Stenotrophomonas, Pseudomonas,* and *Pandoraea.* PCR-analyses to amplify gene encoding chlorocatechol 1, 2-dioxygenase (C12O) suggested that 11 strains had the C12O genes homologous with *tfdC* of a 3-CBA degradative bacterium, *Burkholderia sp.* NK8 (*tfdC*$_{NK8}$). Three strains had C12O genes homologous with another *tfdC* of *Cupriavidus pinatubonensis* JMP134 (*tfdC*$_{JMP134}$), which is known as a 2,4-dichlorophenoxy acetate degrading bacterium. These facts indicated that chlorocatechol *ortho*-cleavage pathways serve as a lower pathway for the metabolism of chlorocatechol, an intermediate compound of 3-CBA degradation. There are few reports that 3CBA-degrading bacteria possessed the *tfdC*$_{NK8}$-type C12O genes. Furthermore, among the strains with tfdCNK8, two degraders, *Caballeronia jiangsuensis* , and *Paraburkholderia azotifigens*, had their degradative genes in conjugative plasmid, which were able to be transferred to non-degrading *Pseudomonas* bacteria to enable them to degrade 3-CBA. This result implied the possibility of spreading of the degradation genes of chlorocatechol in conjugative plasmids in the environment.

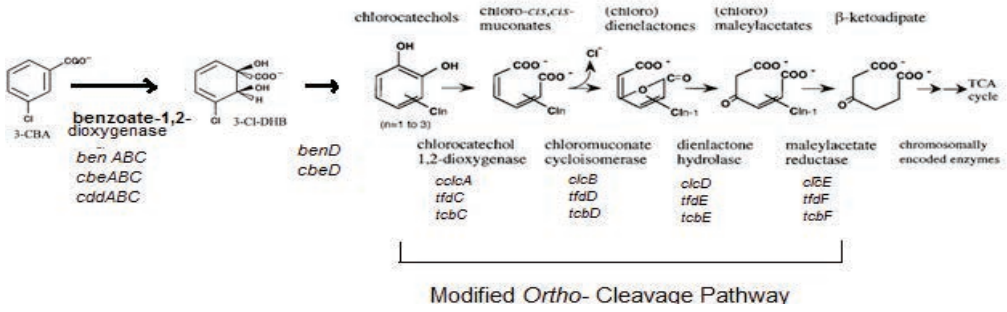


Fig: Degradation pathway of chlorinated aromatic compounds *via* chlorocatechol modified *ortho*-cleavage pathway.
Ogawa et al. (2003) ***Chemical record (New York, N.Y.), 3*****(3), 158–171.**https://doi.org/10.1002/tcr.10059

Biodegradation, 3-Chlorobenzoate, Microorganisms

講演番号：4H02-10
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:30～ ミーティングルーム H

遺伝子組換え生物を特異的に除去する方法の開発

Specific sterilization of genetically modified microorganisms

○加藤 祐輔（農研機構・生物研）
○Yusuke KATO (NIAS, NARO)

産業に用いられる「役に立つが、危険性もある生物（安全性が確認されていない遺伝子組換え生物、生態系を破壊する有用外来生物、研究開発およびワクチン用の病原体など）」が意図せず環境中に拡散するのを防ぐため、他の生物には無害な処理によって特異的に死滅させる方法の開発を進めている。本研究では、大腸菌をモデル系として、他の生物には無害な物質である非天然アミノ酸投与によって宿主に毒性を発揮する人工遺伝回路を導入し、特異的に駆除する方法を構築した。この方法は、改変したメタン生成細菌 *Methanosarcina mazei* 由来の pyrrolysyl-tRNA synthetase および tRNA を用いて、非天然アミノ酸である Z-リジン（N^{ε}-benzyloxycarbonyl-$_L$-lysine）[1]をいずれかのセンスコドンに対応して特異的に導入し、異常タンパク質を生成させて、宿主を障害する。Z-リジンは、他の生物には、ほとんど影響しない。本法は、(1) 他の生物には、影響を及ぼさないこと、(2) 意図せず、標的生物が死滅しないこと、(3) 可能な限り、単純な仕組みで達成できること、(4) 原理的に、全ての生物種に適用できること、などの条件を考慮し、設計されている。

We are developing a biological containment system, which specifically kills a target living-modified organism (LMO) to bring the “useful but dangerous” organisms under human control, using *Escherichia coli* as a model. In this system, the unnatural amino acid N^{ε}-benzyloxycarbonyl-$_L$-lysine (Z-Lys)[1] is specifically incorporated at a sense codon using a modified pyrrolysyl-tRNA synthetase・tRNA pair which is introduced into host cells. In the presence of Z-Lys, abnormal proteins containing Z-Lys residues are produced and impair the host cells. By contrast, most natural organisms are resistant to Z-Lys. This system is designed after consideration of following: (1) Organisms other than the target LMO are not affected, (2) The target LMO are not unintentionally killed, (3) The system works using a simple mechanism as far as possible, (4) The system is applicable for all kinds of organisms.

1. Yanagisawa *et al.* (2008) Multistep engineering of pyrrolysyl-tRNA synthetase to genetically encode Nε-(o-Azidobenzyloxycarbonyl)lysine for site-specific protein modification. Chem. Biol. 15, 1187-1197.

biological containment, unnatural amino acids, synthetic biology

発表責任者：加藤祐輔（kato@affrc.go.jp）

講演番号：4H02-11
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:30～ ミーティングルーム H

微生物を用いた新規雨水浄化処理装置の開発

Development of a New Rainwater Purification System Using Microorganisms

○戸倉 隆人、荒木 希和子、久保 幹（立命館大生命）
○Takahito TOKURA, Kiwako S. ARAKI, Motoki KUBO (Ritsumeikan Univ.)

【背景・目的】　震災等の被害が起きた地域や、雨の少ない場所では水不足に直面する。その備えとして雨水タンクの利用が有効とされるが、雨水には有機物等が混在しているため、長期的な貯水では水質の汚濁が起こるという課題がある。したがって安全に雨水を利用するためには、タンクの水を浄化し水質を維持することが重要である。当研究室では環境微生物と対流による水域の自浄作用に着目し、ポンプおよび微生物吸着担体を入れたカラムによって自浄作用を模した雨水浄化処理装置を開発した。この装置ではタンクに貯水され給水ポンプにより対流を発生させることで、カラムに保持させた環境微生物に十分な量の酸素を供給する。装置を流れる水の流速を調整して酸素供給量を変えた 2 種類のカラム内で好気的及び嫌気的環境を再現し、それぞれ環境に順応した微生物の増殖をしている。本研究では、この雨水浄化処理装置の水質を測定し長期的な浄化作用と水質維持能力を調査してその評価を行うことを目的とした。

【方法・結果】　好気的環境カラムでは 9.0 L/min に設定したものを 2 本、嫌気的環境カラムでは 0.6 L/min に設定したものを 1 本の計 3 本が装備されている。2018 年の 5 月から 2020 年 7 月までの期間、1 週間に 1 回装置のタンクから水を採取した。採取した水は、全炭素量（TC)、無機態炭素量（IC)、有機体炭素量（TOC)、全窒素量（TN)、色度、濁度、電気伝導率（EC)、pH の項目で測定した。また、化学的酸素要求量（COD）を月に 1 回測定した。水質比較のため、市販雨水タンクの水質を月に 1 回採取した。その結果、2018 年 4 月～2019 年 3 月、2019 年 4 月～2020 年 3 月、2020 年 4 月～7 月までにおける TC の平均値は、それぞれ 9.88 mg/L、9.03 mg/L、6.99 mg/L となり、IC の平均値は 8.75 mg/L、7.89 mg/L、6.05 mg/L となった。TOC は、1.13 mg/L、1.14 mg/L、0.93 mg/L であり、全体の 11.4～13.3%であった。市販雨水タンクは装置と比較すると、IC の値が小さい特徴が見られた。色度は、2.5 度、3.2 度、2.1 度であり、濁度は 0.3 度、0.3 度、0.1 度となり、市販雨水タンクとの差は小さかった。COD は、2020 年度での値は、0.42～0.94（平均 0.59） mg/L であり値の変化は僅かであった。市販雨水タンクでは、0.34～4.74（平均 1.40） mg/L であり大きく値が変動した。月に 1 回、3 本のカラムから担体を採取し slow-stirring 法により総細菌数を定量した。その結果全年度を通して総細菌数は、2 本の好気的環境カラムでは 4 月から 8 月までは減少し、9 月以降増加傾向を示した。また、嫌気的環境カラムにおいても好気的環境カラムと同様の傾向を示した。市販雨水タンクではスラッジが沈殿するが、装置ではそのスラッジはほとんど見られなかった。これらの結果から、装置の稼働により微生物の働きが促進され、水質の保持も行われていると考えられた。

I have developed a rainwater treatment system that mimics the self-cleaning action of environmental microorganisms and convection in a water body. I measured the water quality of the device and evaluated its ability to maintain water quality over the long term.

Convection, Microbial adsorption carriers, Water quality maintenance

講演番号：4H02-12
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:30～ ミーティングルーム H

セルラーゼ生産におけるセルラーゼ誘導物質の探索

Search for cellulase-inducers in cellulase production

○加川 雄介、齋藤 悠香、西山 竜士、野口 拓也、平松 紳吾、山田 勝成（東レ株式会社）
○ Yusuke KAGAWA, Haruka SAITO, Ryuji NISHIYAMA, Takuya NOGUCHI, Shingo HIRAMATSU, Katsushige YAMADA (TORAY Industries, Inc.)

【研究背景・目的】
当社では、食糧と競合しないセルロース系バイオマスから糖を製造し、その糖を用いた微生物変換によるポリマー原料など各種汎用化学品製造までの一連の研究に取り組んでいる。その最初のステップにおいて、セルロース系バイオマスから安く糖を製造するためには、糖化酵素であるセルラーゼの製造コストを低下させる必要がある。そこで、オンサイトでのセルラーゼ低コスト生産を目指し、セルラーゼ生産および分泌能が高い*Ｔｒｉｃｈｏｄｅｒｍａ　ｒｅｅｓｅｉ*　ＱＭ９４１４標準株から、セルラーゼ高生産変異株の獲得に向け、非遺伝子組換え技術による育種を行った。その結果、当社独自のセルラーゼ超高生産変異株*Ｔ．ｒｅｅｓｅｉ*　Ｔ１２８１株を獲得した（２０１９年度東京大会にて発表）。しかし、セルラーゼ低コスト生産には、高生産変異株の獲得のみならず、培地費対して高い割合を占めるセルラーゼ誘導物質の低コスト化も必要であることから、一般的なセルラーゼ誘導物質であるパルプに代わる、安価なセルラーゼ誘導物質の探索を試みた。
【研究成果】
まず、安価なセルラーゼ誘導物質として、数多の安価なセルロース含有バイオマスを用いた培養を行った。その結果、トウモロコシの種皮（コーンハル）を用いた場合において、セルラーゼ生産速度が速いだけでなく、生産性も高いことが判明した。一方、培養槽内に固形分として残存しないセルラーゼ誘導物質を用いた培養プロセスを目指し、液糖に注目した培養の検討を行った。その結果、*Ｔ．ｒｅｅｓｅｉ*　Ｔ１２８１株は、公知のセルラーゼ高生産株である*Ｔ．　ｒｅｅｓｅｉ*　ＰＣ－３－７株よりも高いことが明らかとなった。本大会では、セルラーゼ誘導物質として、安価バイオマスや液糖を用いた培養検討結果をベースに、Ｔ１２８１株の特徴について発表する。

As a result of breeding to obtain a cellulase high-production mutant strain, our original cellulase ultra-high production mutant strain *Trichoderma reesei* T1281 strain has been acquired so far. At this convention, the characteristics of the T1281 strain will be announced based on the results of culture research using inexpensive biomass corn hull and liquid sugar as cellulase inducers.

cellulase, trichoderma, biomass

発表責任者：加川雄介（yusuke.kagawa.t8@mail.toray）

講演番号：4H02-13
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:30～ ミーティングルーム H

ベタイン型添加剤によるセルラーゼの活性化 ～単離酵素と混合した複数の酵素に与える活性化効果～

Facilitation of cellulose saccharification by cellulase in the presence of betaine-type additives - activation of isolated or mixed enzymes-

○三宅 子龍、甲元 一也（甲南大 FIRST）
○Shiryou MIYAKE, Kazuya KOUMOTO (Konan Univ.)

非可食性バイオマスを原料としたバイオエタノールの製造は、化石燃料に代わるエネルギー資源として注目されている。バイオマスに含まれるセルロースの分解では、環境負荷の少ない酵素分解法が検討されているが、分解効率や酵素の使用量などに課題が残る。我々の研究室ではベタイン型添加剤がセルラーゼ（Trichoderma reesei 由来）によるセルロースの糖化反応を促進することを以前の年次大会で報告してきた。ただし、セルラーゼ中のどの酵素が活性化しているのか、その詳細は明らかとなっていなかった。そこで本研究では、セルラーゼに含まれる酵素を分離し、個々の酵素のベタイン型添加剤による活性化について評価、検討を行った。

酵素の分離はゲル排除クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーで行った。セルラーゼに約 47%含まれるセロビオハイドロラーゼ（CBH1、2）の活性を評価したところ、ベタイン型添加剤の添加によって活性化され、CBH1 では最終的な遊離糖濃度が 1.3 倍に、CBH2 では 2.2 倍に増加した。同様の活性化効果はエンドグルカナーゼでも確認され、ベタイン型添加剤がセルラーゼに含まれる酵素すべてを活性化していることが明らかとなった。発表では、分離した酵素を混合し、ベタイン型添加剤がセルラーゼという複合酵素を活性化するメカニズムについてその詳細を報告する。

Saccharification of cellulose in biomass by use of cellulase is considered to be one of the useful methods. However, insufficient saccharification efficiency and the large usage for biomass conversion hamper the practical applications. We previously reported that betaine-type additives facilitate the cellulose saccharification by cellulases. However, it was unclear which enzyme in the cellulases was activated. In this study, we purified the cellulase and evaluated the facilitation effect of individual and mixed enzymes by betaine-type additives.

The activity of CBH1 and CBH2 and EGs, was increased by addition of betaines, the sugar concentration increased 1.3 time and 2.2 time in CBH1 and CBH2, respectively. Thus, it was clarified that all the enzymes contained in cellulase were activated by addition of betaines.

Betaine type additive, Cellulase, Biomass

発表責任者：甲元一也（koumoto@konan-u.ac.jp）

講演番号：4H02-14
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:30～ ミーティングルーム H

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

Breeding of cellulase-producing *Saccharomyces cerevisiae*

○松崎 浩明、渡邉 翔介、志波 勇介、今久保 友則、藤田 雄大、秦野 琢之（福山大生命工）
○Hiroaki MATSUZAKI, Shosuke WATANABE, Yusuke SHIWA, Tomonori IMAKUBO, Yudai FUJITA, Takushi HATANO (Fukuyama Univ.)

近年、エネルギー消費量の増大により化石燃料の枯渇が危惧されている。そこで、我々は遺伝子導入によりアルコール発酵酵母 *Saccharomyces cerevisiae* にセルラーゼ生産能を付与し、セルロース系バイオマスからバイオエタノールを生産することを目指している。本研究では、まず細菌 *Cellulomonas fimi* 由来のエンド型セルラーゼ (cenA) とエキソ型セルラーゼ (cex) および酵母 *Saccharomycopsis fibuligera* 由来のβ-グルコシダーゼ (BGL1) の3種類の酵素の生産能を付与することを検討した。*cenA* と *cex* の分泌発現プラスミド pHM1061 は、*cenA* と *cex* を *GAP* プロモーターと *MEL1* 分泌シグナル配列の下流に連結して構築した。また、*BGL1* 分泌発現プラスミド pHM1062 は、*BGL1* を *GAP* プロモーターに連結して構築した。これらのプラスミドを導入した *S. cerevisiae* 二重形質転換体は、コンゴーレッド染色、MUC 発色法、および *p*-NPG 活性から 3 種類の酵素の分泌生産が確認できた。しかし、エンド型セルラーゼ活性 (cenA の活性) は低いと考えられた。次に、酵母 *Cryptococcus flavus* 由来のカルボキシメチルセルラーゼ遺伝子 *CMC1* (cDNA) の分泌発現プラスミド pSC7 を導入した三重形質転換体は、エンド型セルラーゼ活性を強化でき、紙をある程度分解できた。さらに、紙の分解を向上させるためセロビオハイドロラーゼの生産を検討している。

Recently, it is apprehensive to run out of the fossil fuel by expansion of energy consumption. We aim for production of bioethanol from cellulosic materials by breeding of cellulase-producing *Saccharomyces cerevisiae* using genetic engineering. In this study, we investigated production of three types of heterologous cellulolytic enzymes, endoglucanase cenA, exoglucanase cex, both from the *Cellulomonas fimi*, and *β*-glucosidase from the *Saccharomycopsis fibligera* in *S. cerevisiae*. We constructed a plasmid pHM1061 for co-expression of *cenA* and *cex* with the *MEL1* signal sequence for secretion under the control of the *GAP* promoter. A plasmid pHM1062 for expression of *BGL1* under the control of the *GAP* promoter was also constructed. A double transformant of *S. cerevisiae* with these plasmids was produced and secreted three types of cellulolytic enzymes. However, the activity of endocellulase (the cenA activity) was low. The activity of endocellulase was improved by introducing a plasmid pSC7 for expression of the carboxymethylcellulase gene, *CMC1*, from the *Cryptococcus flavus* into the double transformant, and papers were partly degraded. We examine production of cellobiohydrolase.

cellulase, *Saccharomyces cerevisiae*, ethanol fermentation

発表責任者：松崎 浩明（matsuzaki@fukuyama-u.ac.jp）

講演番号：4H02-15
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:30～ ミーティングルーム H

遺伝子組換え大腸菌によるフェニル乳酸発酵をモデルとする発酵阻害メカニズムの解明
Fermentation inhibition of phenyllactic acid production by recombinant *Escherichia coli*
○川口 秀夫[1]、蓮沼 誠久[1]、佐塚 隆志[2]、高谷 直樹[3]、近藤 昭彦[1] ([1]神戸大学、[2]名古屋大学、[3]筑波大学)
○Hideo KAWAGUCHI[1], Tomohisa HASUNUMA[1], Takashi SAZUKA[2], Naoki TAKAYA[3], Akihiko KONDO[1] ([1]Kobe Univ., [2]Nagoya Univ., [3]Tsukuba Univ.)

リグノセルロース系バイオマス糖化液は、グルコース等の糖を含む多様な成分で構成され、この糖化による副産物の一部が微生物の増殖および発酵に悪影響を及ぼす“発酵阻害”物質として作用する。この複雑で多様な成分構成が、バイオマス糖化液利用における発酵阻害リスクの予想とそのメカニズムの特定を困難にしている。そこで本研究では発酵阻害のメカニズムを解明するため、分子構造をもとに発酵阻害物質を 5 種に分類し、遺伝子組換え大腸菌のフェニル乳酸発酵をモデルに、各化合物群の添加による発酵阻害を定量的に評価した。イネ科 C4 植物ソルガムの 3 系統を材料に酵素糖化液を調製し、糖化液中の発酵阻害物質濃度を GC-MS で測定した。同定された発酵阻害候補化合物を 5 つの化合物群に分類し、各化合物群をフェニル乳酸発酵の培地に 20～1000 mg/L の濃度で添加して、発酵阻害とその用量依存性を調べた。その結果、これまで報告例の多いフルフラール類だけでなく、フェニルアルデヒドや安息香酸系の化合物が低濃度から顕著な発酵阻害作用を示すことを明らかにした。
本研究は、本研究は JSPS 科研費 基盤研究(B)19KT0009 および基盤研究(C)16K07665 の助成を受けて実施した。

Fermentation inhibition is one of the major issues to apply lignocellulosic hydrolysate for microbial production. The complexity and variety of fermentation inhibitors make it difficult to interfere with understanding the inhibitory mechanism. In the present study, we classified fermentation inhibitors into 5 groups based on the molecular structures, and examined inhibitory effect of each group on phenyllactic acid production by recombinant *Escherichia coli* in order to clarify the mechanism of fermentation inhibition. Enzymatic hydrolysate was prepared from three lines of sorghum bagasse, and the contents of fermentation inhibitor were determined by GC-MS. The 5 groups found in the sorghum hydrolysates were individually added in medium (20～1000 mg/L),and phenylaldehydes and benzoic aids inhibited phenyllactic acid production, as well as furfurals.
The work was supported in part by a KAKENHI Grant‐in‐Aid for Scientific Research (B) (JP19KT0009) and Scientific Research (C) (16K07665) from Japan Society for the Promotion of Science (JSPS), Japan.

Escherichia coli, Fermentation inhibition, biomass

発表責任者：川口 秀夫（kawaguchi_h@port.kobe-u.ac.jp）

講演番号：4H02-16
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:30～ ミーティングルーム H

糸状菌 *Trichoderma reesei* を用いた転写因子制御による誘導物質フリーの糖化酵素生産システム

Inducer-free cellulase production system based on transcription factor modification in the industrial fungus *Trichoderma reesei*

○新井 俊陽、一瀬 桜子、柴田 望、掛下 大視、児玉 裕司、小山 伸吾、五十嵐 一暁、瀧村 靖（花王・生科研）
○Toshiharu ARAI, Sakurako ICHINOSE, Nozomu SHIBATA, Hiroshi KAKESHITA, Hiroshi KODAMA, Shingo KOYAMA, Kazuaki IGARASHI, Yasushi TAKIMURA (Biol. Sci. Res., Kao Corp.)

糸状菌 *Trichoderma reesei* は、適切な生産誘導を行うことで培養液中に糖化酵素を大量に分泌生産することから、リグノセルロース系バイオマスの高度利用に向けた糖化酵素の生産宿主として世界的に用いられてきた。しかし、その世界最大とも言われるタンパク質生産能力を最大化するためには誘導物質としてセルロースや高価な可溶性誘導糖を使用する必要があり、不溶性基質を用いた特殊な生産プロセス構築やコストハードルを抱えていた。

これまで転写制御因子の改変により、誘導物質を利用せずともセルラーゼ及びキシラナーゼを生産可能な菌株の作出に向けてセルラーゼ発現機構の解析が進められてきたが、本研究では転写因子である Xyr1 及び Ace3 の改変・恒常発現により、安価な非誘導炭素源であるグルコースのみを利用した糖化酵素高生産を達成した。これにより、*Trichoderma reesei* を利用した酵素生産における使用炭素源の特殊性が解消される。さらには誘導物質の利用なく強力なプロモーターを利用可能となることで、糖化酵素以外の様々なタンパク質生産など、汎用宿主としての応用が期待される。

The filamentous fungus *Trichoderma reesei* has been used worldwide as a host for the production of saccharification enzyme for cascade utilization of lignocellulosic biomass, because it can secrete a large amount of enzymes in the culture medium with appropriate induction. However, in order to maximize its protein production potential, it is necessary to use cellulose or expensive inducer sugars, and has the disadvantages of specialized process construction and cost hurdles.

The mechanism of cellulase expression has been analyzed to create strains that can produce cellulase and xylanase without inducers, in this study, we have achieved high production of cellulases using only glucose, the most commonly used non-inducible carbon source, by the modification and constitutive expression of transcription factors Xyr1 and Ace3. This result resolves the peculiarity of the carbon source used in *T. reesei* and reduce the cost of saccharification enzymes, which has been a bottleneck of second-generation biorefineries. Furthermore, the availability of strong promoters without inducers is expected to lead to applications as a general host for the various protein production.

Trichoderma reesei, cellulase, transcription factor

発表責任者：小山 伸吾（koyama.shingo@kao.com）

講演番号：4H02-17
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:30～ ミーティングルーム H

木材腐朽菌を用いた、竹、ダンチクからのエタノール生産

Ethanol production from bamboo and giant reed by using wood-decay fungus

○島崎 幹生、山中 優花、堀沢 栄 (高知工科大学)
○Motoki Shimasaki, Yuka Yamanaka, Sakae Horisawa (Kochi Univ. Technol.)

セルロース系原料からのエタノール生産では脱リグニンを含む前処理や糖化に物理・化学処理が使われている。そのコストやエネルギーなどの環境負荷および発酵阻害物の生成が問題となっている。生物処理が考えられ、植物細胞壁成分の分解酵素を生産する木材腐朽菌の利用が提案できる。木材腐朽菌は発酵する能力も持ち合わせているので、セルロース原料からバイオエタノールを生成する過程の全てに関与することができ、コスト低減や時間短縮が期待できる。本研究ではセルロース原料として増殖速度が大きく環境問題も大きいダンチク（*Arundo donax*）とモウソウチク（*Phyllostachys edulis*）、スギ（*Cryptomeria japonica*）を用い、発酵能力が高い木材腐朽菌であるスエヒロタケ（*Schizophyllum commue*）を用いてエタノールの発酵試験を行い、収率を評価した。また、フラスコに 1%のセルラーゼを加えた発酵系においても発酵実験を実施した。結果から、それぞれのバイオエタノール生産の能力、セルラーゼによるバイオエタノール生産の有効性を評価した。

In the production of ethanol from cellulosic materials, physical and chemical treatments are used for pretreatment and saccharification, including delignification; however, cost and energy of these processes, as well as the formation of fermentation inhibitors, have become problems. The use of wood-rotting fungi, which produce enzymes that degrade lignin, cellulose, and hemicellulose, is an alternative method. Since some of the fungi also can ferment, it might be applied to a consolidated bioprocess for producing bioethanol from cellulose materials with reducing costs and time. In this study, *Shizophyllum commue*, having a high fermentation ability, was used for the examination of ethanol fermentation using giant reed (*Arundo donax*), moso bamboo (*Phyllostachys edulis*), and cedarwood (*Cryptomeria japonica*) as cellulose raw materials. The experiments added 1% cellulase to flasks were also carried out. Results showed the effectiveness of cellulase for direct saccharification from biomass.

bioethanol, wood-decay fungus, bamboo

発表責任者：堀沢　栄（horisawa.sakae@kochi-tech.ac.jp）

講演番号：4H04-01
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:30～ ミーティングルーム H

THE EVALUATION OF SECONDARY INJURY IN HEATED *ESCHERICHIA COLI* CELLS BY DIFFERENT ENUMERATION METHODS

○Khanh Vo[1], Ryoko Asada[1,2], Jin Sakamoto[2], Tetsuaki Tsuchido[2], Masakazu Furuta[1,2] ([1]Dept. Quantum and Radiation, Grad. School of Engineering, Osaka Prefecture Univ., [2]Research Center of Microorganism Control, Organization of Research Promotion, Osaka Prefecture Univ.)

Background. The inactivating action of heat treatment on harmful microorganisms has been widely studied. Injured bacterial cells generated by pasteurization treatment are among the recent concerns in food industry. In our previous reports, the heat sensitivity of *E. coli* cells was affected by the growth medium as well as the addition of antioxidant compounds to the recovery medium[1, 2)]. The injured population has been enumerated conventionally by using the double plating method, in which selective and non-selective agar media. The reactive oxygen species accumulation contributes to inactivate microbial cells seen as the secondary injury, which occurs during recovery period after heat treatment. We utilized different subculture methods[3)] in this study to evaluate the secondary injury induced in heated *E. coli* cells. The effects of oxidative stress in injured cells could be evaluated qualitatively as well as quantitatively. This approach may contribute to the understanding of the resuscitation of injured bacterial cells.

Materials and methods. *Escherichia coli* OW6 were grown in L-broth or EM9 medium. The cells were grown to mid-exponential phase, harvested then heated at 50^0C in 50mM potassium phosphate buffer, pH 7.0. The injured population was enumerated from the difference between two different subculture methods, the conventional plate counting (PC), the microcolony detection (MD)[3)], most probable number (MPN), and growth delay analysis (GDA)[5)] method. Several reducing and reactive oxygen species (ROS) agents were added to the medium to enumerate the population subjected to the secondary injury.

Results. Each subculture method has advantages as well as disadvantages for the injured population estimation. Using the viable-colony formation, the PC and MD method has shown similar results in the heat resistance of *E. coli* cells, further, the MD method gave us additional another prospective to enumerate injured populations with the growth delay time for microcolony formation. On the contrary, the heat resistance was presented differently between the MPN and GDA methods, while *E. coli* cells were scarcely affected by the heat treatment in the MPN assay. The state of media also affected the resuscitation of injured cells, as demonstrated in the difference between the PC and MPN data. The growth delay time analysis in the MD and GDA method suggested divergence in the resuscitation of heat-injured cells in different media. With this assessment approach, we emphasized the importance of the enumeration of injured cells for more reliable measurement in control microbiological contamination.

References. 1) Wada, A. *et al. Abstr. Ann. Meet. of Jpn. Soc. Food Microbiol.* (2018). **2)** Khanh, C. V., *et al. Abstr. Ann. Meet. of Soc. Antibacterial and Antifungal Agents, Jpn.* (2019). **3)** Tsuchido, T., *CMC Pub. Co. Tokyo.*, 209 (2020). **4**) Ogawa, H., *et al. Sci. Rep.*, 5:10061. (2015). **5)** Tsuchido, T., *Biocontrol Sci.* 22(2), 131. (2017).

Injured bacteria, thermal treatment, *Escherichia coli*

講演番号：4H04-02
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:30～ ミーティングルーム H

Promotion of nitrogen-fixation activity of diverse heterotrophic diazotrophs by supplying extracellular electrons from humin, a solid-phase humic substance.

○SUJAN DEY[1], TAKUYA KASAI[1,2], ARATA KATAYAMA[1,2] ([1]Nagoya University, Department of Civil and Environmental Engineering., [2]Nagoya University, Institute of Materials and Systems for Sustainability, Nagoya University (IMaSS).)

Reduction of chemically inert atmospheric N_2 to useable form N, such as NH_3 or NH_4^+, is the one of the important reaction in global biogeochemical cycle. NH_3 is one of the most widely used chemicals in industrial and agricultural sectors globally. Almost 80% of the NH_3 produced are used for making chemical fertilizers. At present, majority of the NH_3 is produced by energy and carbon intensive Haber-Bosch process, reducing atmospheric N_2 to NH_3 with the expense of 1-2% of the global energy supply and consequently making this process unsustainable. Therefore, it is anticipated to develop an efficient alternative of Haber-Bosch process, and hence, in this study, we contemplated the promotion of biological nitrogen fixation (BNF) of whole cell microorganisms as one of the alternatives. In case of BNF, nitrogenase enzyme of the N-fixers reduce N_2 to NH_3 by series of electron transfer from reducing equivalents using ATP. The aim of this study was to clarify the capability of humin, an environmentally harmless organo-mineral complex extracted from soil, as extracellular electron mediator to N-fixers and thus promoting BNF activity. For this purpose, we developed the N-fixing consortia and successfully observed humin promoted BNF activity using acetylene reduction assay and measuring the increase of total N content. We studied the BNF promotion mechanism of humin, by using oxidized and reduced humin and found that only the consortium with reduced humin showed the N-fixing activity. Moreover, humin promoted N-fixing activity of the diverse heterotrophic N-fixers was also observed. These results indicate that humin promotes BNF activity of the diverse diazotrophs by supplying extracellular electrons to the intact cells.

Biological nitrogen fixation, Humin, Extracellular electron mediator

発表責任者：Sujan Dey（dey.sujan@b.mbox.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：4H04-03
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:30～ ミーティングルーム H

Improvement of Kluyeromyces marxianus DMKU3-1042 by repetitive long-term cultivation at high temperature

○Sornsiri PATTANAKITTIVORAKUL[1], Tatsuya TSUZUNO[1], Tomoyuki KOSAKA[1,2], Mamoru YAMADA[1,2] ([1]Grad. Sch. of Sci. and Tech. for Inno., Yamaguchi Univ., Japan, [2]Res. Cen. For TMR, Yamaguchi Univ., Japan)

The heat generated during the fermentation process has a significant impact on cell growth and survival as well as fermentation ability, so the cost of a cooling system is essential for industrial ethanol production. Therefore, fermenting yeast is required to withstand high temperatures in addition to other stresses accumulated during fermentation. *Kluyeromyces marxianus* DMKU3-1042 as one of the thermotolerant yeast strains can produce ethanol at high temperature and utilize various sugars, and its complete genome sequencing is available [1, 2]. We isolated four adapted strains from *K. marxianus* DMKU3-1042, ACT001, ACT002, ACT003 and TML001, by repeated long-term cultivations at high temperatures. The former three strains (ACT) and the remaining one strain showed distinct tolerances to ethanol and acetic acid or formic acid, but they were similarly tolerant to furfural and hydroxymethylfurfural. ACT strains showed very similar phenotypes of stress tolerances to each other and produced a higher concentration of ethanol than the parental strain in a medium containing 16% glucose at high temperatures and completely utilized glucose within 24 h at 40 and 42 ℃. On the other hand, TML001 showed stronger ethanol tolerance than the parental strain and ACT strains. All adapted strains were subjected to next generation sequencing and the detected mutation points were confirmed by direct sequencing, indicating that ACT001, ACT002, ACT003 and TML001 have 2, 4, 1 and 7 mutation points, respectively. Furthermore, to understand the mechanism of stress tolerance, especially a low pH tolerance, transcriptome analysis of ACT001was performed.

References

1. Limtong, *et al.*, *Bioresour. Technol.* 98:3367-3374. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.10.044 (2007)
2. Lertwattanasakul, *et al.*, *Biotechnol. Biofuels.* 8:47. https://doi.org/10.1186/s13068-015-0227-x (2015)

Long-term cultivation, Kluyveromyces marxianus, Stress tolerance

発表責任者：Mamoru Yamada（m-yamada@yamaguchi-u.ac.jp）

講演番号：4H04-04
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:30～ ミーティングルーム H

Adaptive improvement of a thermotolerant xylose-fermenting yeast isolated from Laos

○ Koudkeo PHOMMACHAN[1], Chansome Keo-oudone[2], Mochamad Nurcholis[3], Somchanh Bounphanmy[2], Kosaka Tomoyuki[1,4], Mamoru Yamada[1,4] ([1]Grad. Sch. of Sci. and Tech. for Inno, Yamaguchi Univ., [2]Fac. of Sci., Nat. Univ. of Laos, [3]Fac. of Agri. Tech., Univ. of Brawijaya, [4]Res. Cen. for TMR, Yamaguchi Univ.)

Efficient conversion of xylose to ethanol under various stresses is one of the major challenges for bioethanol production with lignocellulosic biomass. During ethanol fermentation, yeast cells are exposed to high concentrations of substrates, lignocelluloses-derived inhibitors, and the end of products as stressors. In this study, we screened thermotolerant yeast strains from Laos and an efficiently xylose-fermenting yeast, *Candida tropicalis*, was isolated. The strain, X-17, produced 13.7 g/L ethanol when cultured in a medium containing 20 g/L glucose and 20 g/L xylose at 35 ˚C. However, the strain was relatively sensitive to high concentrations of glucose. In order to improve the sensitiveness and tolerance to various stresses, X-17 was applied for the development of resistant strains to various stresses by the long-term repeatedly cultivation in the presence of a high concentration of glucose at high temperatures. An adapted strain X-17.2b obtained was found to be resistant to high temperature, high concentration of glucose, ethanol, furfural, and hydroxymethylfurfural, and showed higher ethanol production than the parental strain when cultured in medium containing 160 g/L glucose. Moreover, X-17 and X-17.2b were subjected to next-generation sequencing analysis, and their sequences were compared with that of *Candida tropicalis* MYA-3404 in a public database, suggesting that X-17.2b has 9 mutation points, some of which may contribute to the stress resistance of X-17.2b.

Adaptation, Xylose-fermenting yeast, Long-term cultivation

発表責任者：Mamoru Yamada（m-yamada@yamaguchi-u.ac.jp）

講演番号：4H04-05
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:30～ ミーティングルーム H

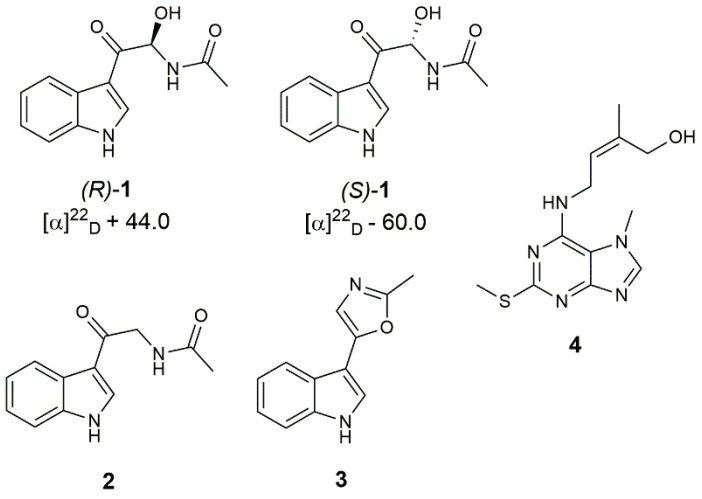
A new cytokinin-type compound and cytotoxic tryptamine derivatives from *Streptomyces* sp. 80H647

○ Julius LOPEZ[1], Toshihiko NOGAWA[1], Yushi FUTAMURA[1], Harumi AONO[1], Kazuko YOSHIDA[1], Daisuke HASHIZUME[2], Hiroyuki OSADA[1] ([1]RIKEN CSRS, [2]RIKEN CEMS)

[Background] In our search of new bioactive compounds from microorganisms, the one strain-many compounds (OSMAC) approach was applied to the ascamycin-producing strain *Streptomyces* sp. 80H647. Through dereplication efforts and utilizing the principal component analysis (PCA), cytotoxic tryptamine derivatives and a new cytokinin-type compound were found.

[Methodology] *Streptomyces* sp. 80H647 was cultured in different media. Ethyl acetate extracts were obtained and subjected to bioactivity screening and chemical profiling via LC-MS analysis. Both mass and bioactivity data were subjected to PCA. Dereplication was carried out by checking the UV and mass data in the NPPlot and Dictionary of Natural Products databases. The isolation of compounds was carried out by using medium pressure and high-performance liquid chromatography. Structure elucidation was done by a combination of MS and NMR data analyses. The absolute configuration was assigned by comparison of the experimental and calculated ECD data.

[Results] The PCA results of the bioactivity data showed that the extracts from corn steep liquor-dried yeast (CD) medium were unique from the set. A bioactivity-guided isolation led to the purification of *N*-acetyl-α-hydroxy-β-oxotryptamine (**1**), *N*-acetyl-β-oxotryptamine (**2**), and pimprinine (**3**). Interestingly, it was found that compound **1** was a racemate by X-ray diffraction analysis. The purification of the enantiomers was accomplished by using chiral-phase HPLC and the assignment of the absolute configuration was done by calculation of the ECD spectra.



Racemate **1** was cytotoxic to several cancer cell lines while **2** was inactive highlighting the importance of the hydroxy group. Moreover, the enantiomers exhibited the same cytotoxicity against HL-60 cells. On the other hand, a new cytokinin-type compound, 2-methylthio-N^7-methyl-*cis*-zeatin (**4**), was identified. Though it belongs to the cytokinin class, no effect was observed on the growth of *Arabidopsis* at 2 μM. To our knowledge, compound **4** is the first natural N^7-methylated cytokinin to be reported.

cytokinin, racemic natural products, Streptomyces

発表責任者：Julius Adam Velasco Lopez（juliusadam.lopez@riken.jp）

講演番号：4H04-06
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:30～ ミーティングルーム H

A new peptaibol from the fungus *Trichoderma* sp. RK10-F026 by culture condition-dependent screening

○MIRA SYAHFRIENA AMIR RAWA[1,2], Toshihiko Nogawa[1], Akiko Okano[1], Yushi Futamura[1], Takemichi Nakamura[1], Habibah A. Wahab[2], Hiroyuki Osada[1] ([1]RIKEN CSRS, [2]Universiti Sains Malaysia)

【Background】Microbes are the prime sources yielding new secondary metabolites essential for drug discovery and breakthrough. Their potential to provide a wide range of biological activities is remarkable. The conventional approach involving isolation of highly active compounds under normal fermentation conditions only leads to re-discovery of known compounds and therefore is inefficient. Our group has been utilizing the technique of varying culture composition by establishing a microbial fraction library from different culture media in combination with principal component analysis (PCA). During our search for cytotoxic compounds focusing on fungal metabolites at this time, 1133 culture broths were prepared from isolated fungal strains from soils. One broth, *Trichoderma* sp. RK10-F026 cultured in the yeast extract sucrose (YES) medium showed cytotoxicity against K562 leukemia cells. The PCA and LC-MS analysis suggested that the active principles belonged to peptaibols. Four peptaibols were isolated including a new peptaibol, RK-26A along with known, atroviridin B, alamethicin II, and polysporin B. Here we report the isolation, structure elucidation, and biological activity of peptaibols.

【Method】The 16 L culture broth of the YES medium of fungus, *Trichoderma* sp. RK10-F026, which had been isolated from a soil collected in Wako, Saitama in 2010, was extracted with EtOAc. The EtOAc extract was separated by SiO_2- and C18-MPLCs to afford active peptaibol fractions, which were purified by C18-HPLC to give pure peptaibols including RK-26A (**1**).

【Results】Compound **1** showed a doubly protonated molecule at *m/z* 989 $[M+2H]^{2+}$ and two main fragment ions at *m/z* 789 and 1190 in the ESI mass spectrum. The molecular formula was determined to be $C_{93}H_{152}N_{22}O_{25}$ based on HR-ESI-MS (found: *m/z* 989.5736 $[M+2H]^{2+}$ calculated for $C_{93}H_{154}N_{22}O_{25}$ 989.5728). The ^{1}H NMR spectrum showed many α-protons at 3.50 – 4.50 ppm. The ^{13}C NMR spectrum showed 91 signals including two aromatic signals with double intensity and 23 carbonyl signals observed at 170 – 180 ppm. These data confirmed that **1** was a peptaibol. Each amino acid and their sequences were determined according to MS and MS/MS analyses supported by the interpretation of 2D NMR spectra. The absolute configuration of each amino acid was confirmed by the Marfey's analysis, which suggested that all amino acids had L-configuration except for Iva having D-configuration. Compound **1** therefore was assigned as RK-026A forming Ac-Aib-Pro-Aib-Ala-Aib-Ala-Gln-Aib-Val-Aib-Gly-Leu-Aib-Pro-Val-Aib-Iva-Glu-Gln-Pheol, an atroviridin B derivative containing Glu-18. Compound **1** showed cytotoxicity at 4.1 μM of IC_{50} value against K562 cell lines.

peptaibol, microbes, fungi

講演番号：4H04-10
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:30～ ミーティングルーム H

Two PLAT domain-containing proteins, FcPLAT and EtATS3, increase plants resistance to insects.
○ Hyrmeya Eric SAVADOGO[1], Shiomi Yui[1], Junko Yasuda[1], Toshiharu Akino[2], Masamitsu Yamaguchi[1], Hideki Yoshida[1], Takanari Umegawachi[1], Ryo Tanaka[1], Anh Ngoc Dang Suong[1], Kenji Miura[3,4], Kazufumi Yazaki[5], Sakihito Kitajima[1,2] ([1]Department of Applied Biology, Kyoto Institute of Technology, [2]The Center for Advanced Insect Research Promotion, Kyoto Institute of Technology, [3]Faculty of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba, [4]Tsukuba-Plant Innovation Research Center, University of Tsukuba, [5]Research Institute for Sustainable Humanosphere, Kyoto University)

Laticifers cytoplasm is a sticky fluid called latex. Latex is rich in toxic compounds and proteins. Therefore, latex is supposed to play a defensive role against pests in latex-producing plants. However, its composition is poorly understood because there is no latex in model plants. A previous transcriptomic study of latex from *Ficus carica* and *Euphorbia tirucalli* latexes revealed the presence of many unigenes highly expressed with unknown function, including the *F. carica* PLAT (FcPLAT) and *E. tirucalli* ATS3 (EtATS3). They are both characterized by having the PLAT-domain. Since they are highly expressed, they may be involved in the defense system. The purpose of this study is to investigate whether PLAT domain-containing proteins are involved in defense against insects. To test this, Tsukuba system, an improved agroinfiltration method, was used to express latex genes in *Nicotiana benthamiana*. When *Spodoptera litura* were fed with *N. benthamiana* expressing FcPLAT or EtATS3, larval development is retarded. Also, transcriptome analysis of these leaves indicated that ethylene and jasmonate signaling were activated, leading to increased expression of genes for PR-1, β-1,3-glucanase, PR5 and trypsin inhibitors, suggesting an indirect mechanism of PLAT- and ATS3-induced resistance in the host plant. These results indicate that FcPLAT and EtATS3 code defense-related proteins. Furthermore, expression of FcPLAT or EtATS3 in *Drosophila* eye imaginal discs using the UAS-GMR/GAL4 system induced a rough eye phenotype, suggesting the proteins are cytotoxic. The rough eye phenotype was suppressed by coexpression of apoptosis inhibitor p35 or *Drosophila* Diap1 (Death-associated inhibitor of apoptosis 1) suggesting that these genes induced cells apoptosis. Together, these results suggest that FcPLAT and EtATS3 are involved in plants defense against insects.

Laticifer, toxic proteins, UAS-GMR/GAL4 system

発表責任者：Savadogo Hyrmeya Eric（eric.savadogo@hotmail.com）

講演番号：4H04-11
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:30～ ミーティングルーム H

P700 oxidation in photosystem I confers stronger chilling tolerance in cucumber

○Yufen Che[1], Ko Takeuchi[2], Minoru Kumazawa[1], Takeshi Nakano[1,2], Chikahiro Miyake[3], Kentaro Ifuku[1,2] ([1]Grad. Sch. Biostudies, Kyoto Univ, [2]Fac. Agri., Kyoto Univ, [3]Grad. Sch. Agri., Kobe Univ)

Cucumber (*Cucumis sativas* L.) is known as a chilling sensitive plant. In particular, the damage of photosystem I (PSI) is observed when cucumber plants are exposed to a chilling temperature below 10°C. However, the detailed damaging mechanisms, especially their occurrence priorities, have not been clarified yet. Here, we showed that the ability to induce the accumulation of the oxidized PSI reaction center ($P700^+$) under chilling conditions confers stronger chilling tolerance to cucumber. In fact, a cultivar that was unable to induce $P700^+$ accumulation showed a delayed recovery after chilling treatment. Electrochromic shift (ECS) measurements with intact leaves and whole electron transfer rate analyses using isolated chloroplasts indicated a rapid uncoupling of thylakoid membranes in the chilling-sensitive cultivar. Consistently, a more degradation of the γ-subunit of chloroplast ATPase was found in the chilling sensitive cultivar. Interestingly, this uncoupling of chloroplast ATPase at low temperature did not occur in the dark, suggesting the involvement of reactive oxygen species produced in the light. These results suggest that the measurement of $P700^+$ inducibility would be an effective indicator for temperature control and selection of chilling-tolerant cultivars in cucumber cultivation.

Cucumber, Reactive oxygen species, Chilling tolerance

発表責任者：Kentaro Ifuku（ifuku.kentaro.2m@kyoto-u.ac.jp）

講演番号：4H04-12
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:30～ ミーティングルーム H

Rice response to UV-irradiation via chemical biosynthesis pathway and relevant gene expression

○Hoang Anh LA[1], Nguyen Van Quan[1], Tran Dang Xuan[1], Vu Quang Lam[2], Akiyoshi Takami[2]
([1]Hiroshima Univ., [2]Aichi Medical University School of Medicine)

Abstract

In this study, rice seedlings (*Oryza sativa* var. Koshihikari) were subjected to UV-irradiation at different levels of 2 and 4 hours per day (UV2 and UV4, respectively) for five days to find out the effects of UV stress on rice antioxidant activity, chemical biosynthesis, and relevant gene expression. Non-UV treated rice plants were used as control (UVC). Based on the results of anti-radical (DPPH and ABTS) assays, antioxidant activity reveals a trivial role in rice response to UV stress. In the gene expression assay applying relative RT-qPCR, *PAL* gene involving in the formation of phenolics is increasingly expressed by 2- and 2.5-fold in UV2 and UV4, respectively, compared to UVC. However, total phenolic contents (TPC) have no change between control and treatment. While total flavonoids (TFC) are decreased by twice in both UV2 and UV4. The chemical analysis results indicate that *PAL* gene expression is strongly correlated with the synthesis of some specific compounds, including caffeic, syringic, and abscisic acids, which are enhanced in UV-treated rice by twice over control. Especially, salicylic acid is found only in UV2 and UV4 with remarkable amounts of 946.92 and 885.67 μg/g, respectively. Besides, the genes encoding rice diterpenoid phytoalexins comprising *OsCPS4, OsKSL4, CYP99A3, OsMAS,* and *OsMAS2* are overexpressed (ranged from 4- up to 60-fold) under UV stress. Significantly, the overexpression of these genes is tightly linked to the biosynthesis of momilactones A and B. In which, momilactone A is increased by 4- and 6-fold, while momilactone B is 4- and 5-time higher than control in UV2 and UV4, respectively. Our findings can contribute to the development of tolerant rice against UV stress.

Oryza sativa, UV-irradiation, chemical biosynthesis pathway

発表責任者：Tran Dang Xuan（tdxuan@hiroshima-u.ac.jp）

講演番号：4H04-13
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:30～ ミーティングルーム H

An Argon Ion-Induced Pale Green Mutant of *Arabidopsis* Exhibiting Epidermis-Specific Albinism and Accelerated Leaf Senescence

○Alvin SANJAYA[1], Ryohsuke MURAMATSU[1], Shiho SATO[1], Mao SUZUKI[1], Hiroki ISHIKAWA[1], Shun SASAKI[1], Kotaro ISHII[2], Sumie OHBU[2], Tomoko ABE[2], Yusuke KAZAMA[2,3], Makoto FUJIWARA[1,2] ([1]Sophia Univ., [2]RIKEN Nishina Center, [3]Fukui Prefectural Univ.)

We created mutants of *Arabidopsis thaliana* by exposing the dry seeds of wild-type Columbia to accelerated heavy (argon) ions. Following screenings of M3 populations, a novel pale green mutant, designated as Ar50-33-pg1, whose pavement and guard cells in the mature leaf epidermis exhibited complete or severe lack of chlorophyll under fluorescence microscopy, has been isolated.

Backcrossing and segregation analyses confirmed that the pale green leaf phenotype of Ar50-33-pg1, which primarily represents impaired chloroplast biogenesis in mesophyll cells, is associated with the deficiency of epidermal chloroplasts, and is caused by a single nuclear recessive allele. Detailed microscopic analyzes were then conducted using a stroma-targeted GFP as a reporter (a *Protodermal Factor1* (*PDF1*) promoter-driven transit peptide–GFP). The observation results showed that the mutant epidermis contained a population of non-colored plastids in growing seedlings. Interestingly, these plastids were uniformly spherical and equal-sized in guard cells. These implied that binary fission processes of plastids were normal or largely unaffected in mutant leaf epidermis.

Through whole-genome sequencing, Ar50-33-pg1 was revealed to contain a ~1 Mb single deletion in chromosome V that spans about 40 putative or well-characterized protein-coding genes. One of them encoded a known chloroplast-localized metalloprotease, Ethylene-dependent Gravitropism-deficient and Yellow-green 1 (EGY1). An allelism test was then conducted between Ar50-33-pg1 and an *egy1* single-gene mutant. All F1 seedlings were morphologically identical to both parents in that they commonly produced pale green leaves exhibiting epidermal albinism. In addition, the phenotype of accelerated leaf senescence in *egy1* was also conserved in both Ar50-33-pg1 and the F1 plants. Therefore, *EGY1* was deemed to be the main causal allele in Ar50-33-pg1.

Our results reinforced the notion that there is a possible divergence of plastid development mechanism among plant tissues: the pavement and guard cell, which is derived from non-mesophyll tissue, may have a distinct aspect from the already extensively studied mesophyll tissue counterpart.

Arabidopsis thaliana, epidermal plastid chlorophyll, EGY1

発表責任者：Makoto Fujiwara（mtf1@mac.com）

講演番号：4H04-14
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:30～ ミーティングルーム H

Investigation of biological activities of AC94377 and its derivatives in rice

○jianwen wang[1], Kai Jiang[2], Kohji Murase[1], Tsuyoshi Ota[1], Seiji Takayama[1], Asami Tadao[1]
([1]Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo, Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo, Japan, [2]SUSTech Academy for Advanced and Interdisciplinary Studies, Southern University of Science and Technology (SUSTech), Shenzhen, Guangdong, China)

Gibberellins (GAs) are widely acknowledged as essential phytohormones in regulating many aspects of plant growth and development. In our previous work, chemical AC94377 has been confirmed to be a strong GA agonist even though it shares totally unidentical chemical structure with GA. AC94377 has a selectivity toward specific GID1 subtype, which provides a promising idea that flexible chemical regulation of gibberellin signaling by AC94377 or its derivatives. In this talk, we will report that AC94377 is an agonist of GID1 in rice and shows the same selectivity for GID1-subtype as it does in Arabidopsis. Several AC94377 derivatives have been generated and their bioactivity was tested with *in vivo* and *in vitro* experiments. In order to understand how these GA agonists bind to GID1, as well as design more potent GA-mimics with stronger activity or/and selectivity for receptors, our recent efforts were put on the co-crystallization of GID1 with AC94377, especially a key residue substitution was found to improve the expression efficiency of GID1 proteins.

AC94377, GID1, Chemical regulation

講演番号：4H04-15
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:30～ ミーティングルーム H

Identification of effective peptide derived from WSSV-VP15 for protection of *Masupenaeus japonicus* against WSSV

○Jirayu Boonyakida[1], Jian Xu[2], Jun Satoh[3], Takafumi Nakanishi[4], Toru Mekata[3], Tatsuya Kato[1,2,4], Enoch Y. Park[1,2,4] ([1]Department of Bioscience, Graduate School of Science and Technology, Shizuoka University, Shizuoka, Japan, [2]Research Institute of Green Science and Technology, Shizuoka University, Shizuoka, Japan, [3]National Research Institute of Aquaculture, Japan Fisheries Research and Education Agency, Saiki, Oita, Japan, [4]Department of Applied Biological Chemistry, Graduate School of Integrated Science and Technology, Shizuoka University, Shizuoka, Japan)

White spot syndrome virus (WSSV) is one of the most devastating pathogens in penaeid shrimps and could cause huge damage to shrimp aquaculture industries. Yet, there's no effective countermeasure against the virus. We have found that the VP15, a DNA-binding protein and one of the major WSSV structural proteins was effective to protect the WSSV infection in Kuruma shrimp [1]. In this study, the VP-15 was used as a template to generate 4 truncated constructs assigned as $VP15_{aa1\text{-}25}$, $VP15_{aa26\text{-}57}$, $VP15_{aa58\text{-}80}$, and $VP15_{(aa1\text{-}25,\ 58\text{-}80)}$. The proteins were expressed and purified from the *E. coli* and silkworm expression systems. Subsequently, the purified proteins were employed as a protective agent in Kuruma shrimp (*Marsupenaeus japonicus*) against the WSSV using the prime-and-boost strategy. Among the four truncated constructs, $VP15_{aa26\text{-}57}$ provided a significant improvement in shrimp survival after 20 days of infection. Next, $VP15_{aa26\text{-}57}$ has been investigated to identify which domain contains antigenic determinant or not by designing four peptides (KR-11, SR-11, SK-10, and KK-13) covering the amino acid sequence and applied *in vivo*. The SR-11 could enhance shrimp's survival rate when intramuscular administrated using the same strategy. We concluded that the SR-11 is a potent peptide that protects the infection of WSSV in aquaculture. Moreover, gC1qR, a multifunctional protein of innate immunity, was cloned from Kuruma shrimp (MjgC1qR) and expressed using silkworm expression system. Glutathione-S-transferase (GST) pull-down assay was performed to investigate a protein interaction between the MjgC1qR and GST-VP15, GST-$VP15_{aa26\text{-}57}$, or GST-SR-11. Our result revealed that MjgC1qR could interact with GST-VP15 and GST-$VP15_{aa26\text{-}57}$ (GST-SR-11 is currently under investigation). Taken together, Kuruma shrimp may induce an immune response through an interaction with their gC1qR upon the administration of the proteins.

Reference

[1] Boonyakida J., et al., *Fish Shellfish Immunol.*, 101: 152–158 (2020)

WSSV, VP15, Kuruma shrimp

発表責任者：Enoch Y. Park（park.enoch@shizuoka.ac.jp）

講演番号：4H04-16
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:30～ ミーティングルーム H

Dual-mode detection of Chikungunya virus protein using fluorophore-embedded and redox probe-encapsulated liposome

○Fahmida Nasrin[1], Ankan Dutta Chowdhury[1], Ganganboina Akhilesh Babu[1], Achadu Ojodomo John[1], Farzana Hossain[2], Masahito Yamazaki[2], Enoch Y Park[1] ([1]Lab of Biotech, Res Inst of Green Sci and Tech, Shizuoka Univ, [2]Integ Biosci Sec, Res Inst of Elec, Shizuoka Univ)

Recent studies are focusing on biosensor development using nanomaterials in targeting a huge number of analytes to get a high specificity. For this reason, the development of dual-functional biosensors has emerged as an advancement in the field of sensing application, which can combine two or more detection methods in a single platform and ensures better sensitivity and reliability for virus detection. For this purpose, a new model of dual-functional signal amplification system has been developed to detect recombinant Chikungunya virus E1 protein (CHIK-VP) by a combination of fluorescent embedded and redox dye-encapsulated liposome with magnetically modified Fe_3O_4 nanoparticles. Homogeneously distributed amine-functionalized liposomes embedded with hydrophobic quantum dots (QDs) in the lipid bilayer and encapsulated methylene blue (MB) as a redox indicator make the liposome a dual signaling modulator. On the other hand, APTES-coated Fe_3O_4 nanoparticles (Fe_3O_4 NPs) initialize the target liposomes' capture and separation. These two individually synthesized nanomaterials have covalently bound with a specific monoclonal antibody of the target virus. In the virus's presence, these can form a sandwich structure and magnetically separated from its analyte medium. The nanoconjugates have been externally burst out to release both the QDs and MB from the liposome, and the changes in fluorescence and electrochemical signals were monitored, respectively. These signal changes give the quantification of the target CHIK-VP in the range of femtogram to nanogram per milliliter level, making the virus detection system a potential platform for virus detection in the future.

Ref: Microchimica Acta, Volume 187, Article number 674 (2020)

Biosensor, Liposome, Chikungunya virus detection

講演番号：4H04-17
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:30～ ミーティングルーム H

The nature of δ opioid receptor as an immunomodulator in the colitis

○Kazuki NAGATA[1], Hiroshi NAGASE[2], Takuya YASHIRO[1], Chiharu NISHIYAMA[1] ([1]Tokyo Univ of Sci., [2]IIIS)

Recently the contribution of psychological factors to a wide range of biological processes have attracted attention. Psychoneuroimmunology, which explores the interaction between immunity and psychological responses, is a developing research field and considered to be crucial for the pathophysiological control of various diseases especially in modern society, so-called the stressful society. Among various molecules relating to the central nerve system, we focused on opioids, playing important roles in the regulation of sensations and emotions. Opioids are classified into three types: μ, κ, and δ. Several studies have reported that μ opioids suppressed immune responses, resulting in increase of vulnerability to bacterial infections and enhancement of cancer progression. In contrast, the involvement of δ- and κ-opioid receptors in immune responses is largely unknown. In the present study, we evaluated the effects of δ opioid agonists on the animal disease model and analyzed the molecular mechanism by which the δ opioid agonists regulated the inflammation *in vivo* and *in vitro*.

We first verified the effect of a δ opioid agonist, KNT-127 on the pathology of mouse DSS-induced colitis. As a result, weight loss, diarrhea, blood in the stool, and atrophy of the large intestine were improved by systemic administration of KNT−127. Next, we determined the mRNA levels of defensive elements against colitis in colon tissues and confirmed that antimicrobial peptides and tight junction-related molecules in the epithelial cells were not affected by KNT-127. Then, we focused on the immune system and found that the population of macrophages tended to decrease in lymph nodes in the KNT-127 treated mice. In addition, the concentration of IL-6 in the blood, which was markedly increased in colitis mice, was significantly decreased by administration of KNT−127. Furthermore, in the colitis recovery model, the population of Tregs, an anti-inflammatory T cell subset, was increased with KNT-127 administration. The intraperitoneal administration of peripheral-type δ opioid agonist, KNT-127 methiodide that do not pass through the blood-brain barrier significantly alleviated the colitis, elucidating the possibility that the δ opioid agonist directly acted on immune cells. Finally, we performed *in vitro* experiments to evaluate the direct effects of a δ opioid agonist on immune cells. KNT-127 suppressed inflammatory cytokine production by bone marrow-derived macrophages in a concentration-dependent manner and promoted Tregs differentiation from naive $CD4^+$T cells under the Treg-polarizing condition. These data give us the proof that the capacity of δ opioid agonists as an immunomodulator is enough to affect systemic immune responses under the disease condition.

opioid, colitis, immunology

講演番号：4I01-01
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:00～ ミーティングルーム I

イネ受容体型キナーゼ ERC1 による細菌由来 EF-Tu の中央領域 EFa50 の認識

Recognition of EFa50 derived from bacterial EF-Tu by receptor like kinase ERC1 in rice

○伊庭 弘貴[1]、古川 岳人[2]、平井 洋行[2]、蔡 晃植[1,2,3]([1]長浜バイオ大院・バイオ、[2]長浜バイオ大・バイオ、[3]長浜バイオ大・ゲノム編集研究所)
○Koki IBA[1], Takehito FURUKAWA[2], Hiroyuki HIRAI[2], Fank-Sik CHE[1,2,3] ([1]Grad. Sch. of Biosci., Nagahama Inst. of Bio-sci and Tech., [2]Dept. of Bio-sci., Nagahama Inst. of Bio-sci and Tech., [3]GERI, Nagahama Inst. of Bio-sci and Tech.)

シロイヌナズナは細菌由来の翻訳伸長因子 EF-Tu の N 末端領域 elf18 を受容体キナーゼ EFR で認識して PAMPs-triggered immunity(PTI)を誘導する。我々はこれまでに、イネは EF-Tu の中央領域部分の EFa50 を EFR とは異なる受容体で認識して PTI を誘導することを報告し、その受容体候補として受容体型キナーゼ ERC1 を同定した。そこで、ERC1 過剰発現イネを作製し、EFa50 に対する感受性を調べたところ、野生株に比べ EFa50 感受性が増加した。また、ERC1 過剰発現イネの膜画分と EFa50 を混合して抗 ERC1 抗体を用いた共免疫沈降実験を行ったところ、ERC1 と EFa50 が相互作用することが明らかとなった。次に、CRISPR-Cas9 法を用いたゲノム編集により ERC1 機能欠損イネを作製し、EFa50 によって誘導される PTI 応答を調べることにした。*ERC1* 遺伝子の 413 塩基目を Cas9 が切断するように gRNA を設計した CRISPR-Cas9 カセットをアグロバクテリウムを介してイネに導入し、*ERC1* 遺伝子欠損イネの作製を試みた。その結果、2 系統の形質転換体において *ERC1* 遺伝子の 413 塩基目に 1 塩基の挿入変異をホモで持つことが確認できた。作製した 2 系統の形質転換体のうち、CRISPR-Cas9 カセットを持っていない個体に EFa50 を処理したところ、PTI 反応の一つであるカロース沈着の誘導が認められなかった。これらの結果から、ERC1 はイネの EFa50 認識受容体である可能性が高いことが示唆された。

Arabidopsis thaliana recognizes elf18 (N-terminal region of the bacterial translation elongation factor EF-Tu) with EFR and induces PAMPs-triggered immunity (PTI). We reported that rice recognizes EFa50 (central region of EF-Tu) with the receptor kinase ERC1 different from EFR. To clarify whether ERC1 is a true receptor for EFa50, ERC1-overexpressing rice plants were produced. The sensitivity to EFa50 in the OX-rice increased compared with that of the wild type. A co-immunoprecipitation experiment using anti-ERC1 antibody revealed that ERC1 interacts with EFa50. ERC1 knockout mutants prepared with genome-editing did not induce callose deposition, which is one of the PTI reactions even when treated with flagellin. These results suggest that ERC1 may be a receptor for EFa50.

Plant immunity, Elongation factor-Tu, PAMPs

講演番号：4I01-02
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:00～ ミーティングルーム I

Identification of novel effector protein AKSF1 that suppresses rice immune response
イネの免疫反応を抑制する新規エフェクタータンパク質 AKSF1 の同定
○大森 ほのか[1]、川口 雄正[1]、中村 みなみ[2]、平井 洋行[1]、近藤 真千子[1]、蔡 晃植[1,2,3]([1]長浜バイオ大・バイオ、[2]長浜バイオ大院・バイオ、[3]長浜バイオ大・ゲノム編集研究所)
○Honoka OMORI[1], Takemasa KAWAGUCHI[1], Minami NAKAMURA[2], Hiroyuki HIRAI[1], Machiko KONDO[1], Fang-Sik CHE[1,2,3] ([1]Dept. of Bio-sci., Nagahama Inst. of Bio-sci and Tech., [2]Grad. Sch. of Biosci., Nagahama Inst. of Bio-sci and Tech., [3]GERI, Nagahama Inst. of Bio-sci and Tech.)

イネを宿主とする植物病原細菌 *Acidovorax avenae* K1 は、自身が持つ Type III 分泌装置（T3SS）を介してイネ細胞にエフェクタータンパク質を分泌することで活性酸素発生などの免疫反応を抑制する Effector-triggered susceptibility（ETS）というシステムを有している。そこで我々は、*A. avenae* K1 菌株が持つ ETS エフェクターの同定を目的として研究を行った。まず、K1 菌株のトランスポゾン挿入変異株ライブラリを作製し、活性酸素発生抑制能を失った株のスクリーニングを行ったところ、156 個の遺伝子変異株を得た。また、RNA-seq を用いたトランスクリプトーム解析により、イネ感染後に発現量が増加する遺伝子を 1,240 個同定した。スクリーニングで得られた 68 遺伝子とトランスクリプトーム解析により得られた 1,240 遺伝子では 16 遺伝子が重複していたので、この 16 遺伝子の産物が T3SS から分泌されるかを Effective T3 で解析したところ、*A. avenae* K1 suppression factor 1（AKSF1）と名付けたタンパク質が T3SS から分泌される可能性が高いことが明らかになった。そこで、AKSF1 が ETS エフェクターであるかを確認するために、*AKSF1* 欠損株（*KΔSF1*）を作製し ETS 誘導能を調べたところ、*KΔSF1* は ETS 誘導能を失っており、これは AKSF1 の導入により相補されることも明らかになった。また、AKSF1 が T3SS を介してイネ細胞内に輸送されているかどうかを CyaA との融合タンパク質を用いて調べたところ、AKSF1 はイネ細胞内に輸送されるかことが示された。さらに、*KΔSF1* をイネに接種すると、野生型株と比較して病徴の減少と細菌増殖の抑制が観察された。以上のことから、AKSF1 はイネに対する新規 ETS エフェクターであることが明らかになった。*Acidovorax avenae* rice-virulent K1 strain possesses effector-triggered susceptibility (ETS) that suppresses rice immune responses such as H_2O_2 generation. To identify the ETS effector, a library of transposon-tagged K1 mutants was constructed. By screening 4,562 transposon-tagged mutants based on their suppression ability, we found that 156 transposon-tagged K1 mutants lost the ability to suppress the H_2O_2 generation. Mutant sequence analysis, comprehensive expression analysis using RNA-sequencing, and the prediction of secretion through T3SS showed that a protein named *A. avenae* K1 suppression factor 1 (AKSF1) induces ETS. Translocation of AKSF1 protein into rice cells is dependent on T3SS during infection, an AKSF1-disruption mutant lost the ability to suppress PTI responses, and expression of AKSF1 in AKSF1-disruption mutant complemented the suppression activity. When *KΔSF1* were inoculated into the host rice plant, reduction of the disease symptoms and suppression of the bacterial growth were observed. Taken together, our results demonstrate that AKSF1 is a novel ETS effector.

Acidovorax avenae, Rice, Effector-triggered susceptibility

講演番号：4I01-03
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:00～ ミーティングルーム I

植物病原細菌 *Acidovorax avene* のイネ病原性 K1 菌株と非病原性 N1141 菌株が持つ RHIF エフェクターの異なる機能
Different functions of RHIF effectors from rice-virulent K1 strain and avirulent N1141 strain of *Acidovorax avene*

○中村 みなみ[1]、近藤 真千子[2]、川口 雄正[2]、上田 陽莉[2]、大森 ほのか[2]、蔡 晃植[1,2,3] ([1]長浜バイオ大院・バイオ、[2]長浜バイオ大・バイオ、[3]長浜バイオ大・ゲノム編集研究所)
○Minami NAKAMURA[1], Machiko KONDO[2], Takemasa KAWAGUCHI[2], Hiyori UEDA[2], Honoka OMORO[2], Che FANG-SIK[1,2,3] ([1]Grad. Sch. of Biosci., Nagahama Inst. of Bio-sci and Tech., [2]Dept. of Bio-sci., Nagahama Inst. of Bio-sci and Tech., [3]GERI, Nagahama Inst. of Bio-sci and Tech.)

植物病原細菌 *Acidovorax avenae* イネ病原性 K1 菌株をイネに接種すると褐条病斑が認められるが、シコクビエを宿主とする *A. avenae* N1141 株を接種すると、免疫反応の一つである過敏感細胞死 (HR cell death) が誘導される。これまでの研究で、N1141 菌株の接種によって認められる過敏感細胞死は、N1141 菌株の Type III 分泌装置 (T3SS)を介して分泌される Rice HR cell death-inducing factor (RHIF)と名付けたエフェクタータンパク質により誘導されることが明らかとなった。両菌の全ゲノム配列解析を行ったところ、K1 菌株には 350 アミノ酸のうち 13 アミノ酸が異なる K1 RHIF の存在が示された。そこで本年度は、K1 RHIF の機能について研究を行った。まず、N1141 RHIF と K1 RHIF をそれぞれイネの細胞内で一過的に発現させたところ、N1141 RHIF を発現させた細胞でのみ細胞膜透過性の喪失と核 DNA の断片化を伴う過敏感細胞死が認められた。次に、K1 RHIF と N1141 RHIF が T3SS を介してイネ細胞内に輸送されているかどうかを CyaA との融合タンパク質を用いて調べたところ、両 RHIF はイネ細胞内に輸送されることが示された。さらに、K1 菌株の *RHIF* 遺伝子欠損株を宿主であるイネに接種したところ、野生型 K1 株と比較して病徴の縮小と菌体増殖の抑制が認められた。これらのことから、N1141 RHIF はイネの過敏感細胞死を誘導するエフェクターとして機能するのに対し、K1 RHIF はイネへの感染時に必要なエフェクタータンパク質として機能することが明らかとなった。

Rice-avirulent N1141 strain of *Acidovorax avenae* causes rice immune responses including hypersensitive response cell death (HR cell death), but rice-virulent K1 strain dose not. We previously reported that Rice HR cell death-inducing factor (RHIF) of N1141 strain functions as HR cell death inducing effector. Whole genome sequencing showed that K1 strain possesses RHIF that is substituted 13 amino acid residues compared to N1141 RHIF. When N1141 RHIF and K1 RHIF were transiently expressed in rice cells, HR cell death was observed in N1141 RHIF-expressed rice cells. Cya assays showed that K1 RHIF was translocated into rice cells through T3SS. When *RHIF*-deleted K1 mutant was inoculated into rice, reduction of the disease symptoms and suppression of the bacterial growth were observed. These results suggest that N1141 RHIF functions as HR cell death-inducing effector, whereas K1 RHIF functions as susceptive effector in rice.

Rice, Bacteria, Immunity

講演番号：4I01-04
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:00～ ミーティングルーム I

コマツナ内生菌 *Arthrobacter* sp. BR2S-6 株の植物免疫を活性化する成分の解析

Characterization of plant immunity-activating components from *Arthrobacter* sp. BR2S-6

○島脇 遼、黒川 摩利、中野 正貴、中島 将博、朽津 和幸、古屋 俊樹（東京理科大院理工）
○Ryo Shimawaki, Mari Kurokawa, Masataka Nakano, Masahiro Nakajima, Kazuyuki Kuchitsu, Toshiki Furuya (Fac. Sci. Tec., Tokyo Univ. Sci.)

【背景・目的】植物に対して負の影響を与えることなく内部組織に生息する微生物は植物内生菌と呼ばれ、その一部は植物と相互作用することで植物の免疫を向上させる。我々はこれまでに、コマツナから 31 株の内生菌を分離し、タバコ培養細胞 BY-2 と卵菌由来タンパク質エリシターcryptogein を利用した評価系を用いて、植物免疫応答の指標の 1 つである活性酸素種（ROS）生成を亢進する内生菌を 8 株取得することに成功した [1)]。このうちグラム陽性細菌 *Arthrobacter* sp. BR2S-6 株はシロイヌナズナに内生すると、シロイヌナズナのトマト斑葉細菌病菌と軟腐病菌に対する耐病性を向上させた [1)]。この植物免疫活性化には内生菌由来の何らかの成分が関与していると考えられる。そこで本研究では、*Arthrobacter* sp. BR2S-6 株における植物免疫活性化成分の同定を目指し、解析を進めた。
【方法・結果】BR2S-6 株を BY-2 細胞とともにインキュベーションした後に cryptogein を添加すると、本株は BY-2 細胞の cryptogein 誘導性 ROS 生成を亢進する [1)]。BR2S-6 株の培養液を熱処理し、BY-2 細胞と cryptogein を利用した評価系に供したところ、ROS 生成亢進活性は消失した。また、BR2S-6 株の培養液を遠心分離により細胞と細胞外画分に分け、当該評価系に供すると、細胞だけでなく細胞外画分も ROS 生成を亢進した。さらに、細胞外画分を限外ろ過により分離したところ、ROS 生成亢進活性を担う成分は分子量 2 万以上の化合物であることが推測された。以上の結果より、細胞外の活性成分は熱により失活する高分子化合物であることがわかり、タンパク質である可能性が示唆された。
植物免疫を誘導する化合物として、これまでにリポ多糖やフラジェリン等の MAMPs、病原性微生物由来タンパク質であるハーピンやエリシチンが報告されているが、非病原性微生物が生産するタンパク質性の植物免疫活性化成分の報告は未だ少ない。そこで、BR2S-6 株の細胞外画分に着目して研究を進めた。まず、細胞外画分が植物に耐病性を付与できるかを確認するために、BR2S-6 株の細胞外画分をシロイヌナズナの葉に接種し、トマト斑葉細菌病菌を感染させて耐病性を評価した。その結果、BR2S-6 株の細胞外画分を接種すると無接種のコントロールと比較して病斑が減少し、感染した病原菌の数も減少した。現在、細胞外画分から当該活性を示す成分の精製を進めているところである。
1) 黒川摩利、他、日本農芸化学会 2020 年度大会（講演要旨集 2B06a05）.

In this study, we investigated plant immunity-activating components from *Arthrobacter* sp. BR2S-6. The results suggest that extracellular proteins are responsible for the plant immunity-activating ability.

biocontrol, endophyte, plant immunity

発表責任者：古屋俊樹（tfuruya@rs.tus.ac.jp）

講演番号：4I01-05
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:00～ ミーティングルーム I

BSR1 高発現により生じる病害抵抗性の増強に OsCERK1 が必要である
Overexpressed *BSR1*-mediated enhancement of disease resistance depends on OsCERK1
神田 恭和[1,2]、西澤 洋子[1]、鎌倉 高志[2]、○森 昌樹[1,2] ([1]農研機構生物研、[2]東理大院理工)
Yasukazu Kanda[1,2], Yoko Nishizawa[1], Takashi Kamakura[2], ○Masaki Mori[1,2] ([1]NIAS, [2]Grad. Sch. Science and Tech., Tokyo Univ. of Science)

植物の膜局在型受容体は、MAMP と称される広範な微生物に共通して存在する分子パターンを認識し、様々なシグナル伝達系を介して植物免疫応答を活性化する。受容体様細胞質キナーゼ（RLCK）は植物免疫においてキーとなるシグナル因子であると考えられている。我々が見出したイネの RLCK である BROAD-SPECTRUM RESISTANCE 1 (BSR1)は、病害抵抗性において重要な役割を果たす。*BSR1* の高発現は様々な糸状菌病や細菌病に対し強い抵抗性をもたらす。我々は最近、野生型イネにおいても MAMP 認識により誘導される免疫応答に BSR1 が関与すること、BSR1 高発現イネではその応答が亢進していることを見出した。*BSR1* 高発現イネの示す広範な抵抗性は、この免疫応答の亢進によることが予想されたが、実験的な証拠はなかった。そこで本研究では、*BSR1* 高発現イネの示す広範な抵抗性に、MAMP 認識システムが必要かどうかを明らかにすることを目的とした。イネの MAMP 認識に寄与する受容体様キナーゼ遺伝子である *OsCERK1* をノックアウトし、かつ *BSR1* を高発現するイネを作製したところ、いもち病抵抗性の増強は認められなかった。よって、*BSR1* の高発現による病害抵抗性の増強には、MAMP 認識により誘導される免疫システムが必要であることが明らかになった。

Plant plasma membrane-localized receptors recognize microbe-associated molecular patterns (MAMPs) and activate immune responses via various signaling pathways. Receptor-like cytoplasmic kinases (RLCKs) are considered as key signaling factors in plant immunity. BROAD-SPECTRUM RESISTANCE 1 (BSR1), a rice RLCK, plays a significant role in disease resistance. Overexpression of *BSR1* confers strong resistance against fungal and bacterial pathogens. Our recent study revealed that MAMP-triggered immune responses are mediated by BSR1 in wild-type rice and are hyperactivated in *BSR1*-overexpressing rice. The hyperactivated immune responses were suggested to be responsible for the enhancement of broad-spectrum disease resistance. In this study, we verified the above hypothesis by disrupting the MAMP-recognition system in BSR1-overexpressing rice. To this end, we knocked out *OsCERK1*, which encodes a well-characterized MAMP-receptor-like protein kinase. In the background of BSR1 overaccumulation, the knockout of *OsCERK1* nearly abolished the enhancement of blast resistance. This finding indicates that overexpressed *BSR1*-mediated enhancement of disease resistance depends on the MAMP-triggered immune system, corroborating our previously suggested model.

rice, disease resistance, *Pyricularia oryzae*

発表責任者：森　昌樹（morimasa@affrc.go.jp）

講演番号：4I01-06
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:00～ ミーティングルームⅠ

植物は毒針（針効果）で昆虫を撃退する？－シュウ酸カルシウム針状結晶が植物防御タンパク質・物質の働きを劇的に増強する相乗効果

Calcium oxalate needle crystals in plant synergistically enhance the anti-insect defense activity of plant defense proteins

○今野 浩太郎、松本 信弘、行弘 文子（農研機構　生物機能利用研究部門）
○Kotaro KONNO, Nobuhiro MATSUMOTO, Fumiko YUKUHIRO (Institute of Agribiological Sciences, NARO)

シュウ酸カルシウム針状結晶(raphide、以下針状結晶)はパイナップル、キウイ、サトイモ、ヤマノイモ等多くの植物に含まれる 0.1㎜程度の針状構造体で異形細胞に蓄えられている。その役割として植食動物（昆虫等）に対する防御仮説が有力であったが同量の針状結晶でも効果の強弱が一定せず、その耐虫効果と作用メカニズムには不明な点が多かった。針状結晶がしばしばシステインプロテアーゼと共存する（キウイ・パイナップル）ことから、針状結晶が昆虫の組織・細胞に穴を開け耐虫物質の作用点への到達を容易にするという毒針効果の検証を試みた。針状結晶をキウイフルーツから精製しその耐虫効果をヒマ葉に塗りエリサン幼虫（*Samia ricini*）に摂食させ検定した。その結果、針状結晶とシステインプロテアーゼは単独では成長阻害活性が弱いが、両者共存下では極めて強い相乗的殺虫・成長阻害・防御効果が観察された。また針状結晶の存在でシステインプロテアーゼの殺虫性が 16-32 倍程度増強された。シュウ酸カルシウム不定形結晶では全く相乗効果が無く、針状形状の重要性が示された。一方ヤマノイモ葉では針状結晶がキチナーゼの耐虫防御活性を顕著に増強していた。ヤマノイモの抽出液で針状結晶と相乗的に成長阻害効果を示す画分はキチナーゼ活性を持っていた。また、市販 Serratia キチナーゼの殺虫活性も針状結晶の存在で 16-32 倍以上に増強された。サトイモ科植物では、針状結晶がヒトに対する強いえぐみ（痛み）の原因であることが知られている。サトイモ科植物葉は昆虫に対しても激しい摂食拒否行動をおこすがこの原因も針状結晶と摂食拒否誘起物質の相乗作用であることが判ってきた。以上の結果は針状結晶が耐虫物質の効果を増強する効果（相乗効果）あるいは針効果（the needle effect）を持つ毒針であることを明確に示した。針効果の一般性についてもさらに議論する（参考文献：今野浩太郎（2016）化学と生物 54(11)847-852)。

Raphides, needle-shaped calcium oxalate crystals in tissues of many plants, have been thought to play defensive roles against herbivores. However, their effects differed greatly (from no effects to lethal effects) among bioassays and plants, which caused arguments on their defensive roles. We found raphides and cysteine proteases, which coexist in several plants including kiwi fruit and pineapple, shows strong synergistic defense function (lethal toxicity) against lepidopteran insects. Our result suggests the existence of “the needle effect”, which intensifies the bioactivities of other bioactive factors by making holes to the barriers (cell membrane, cuticle, epithelium, etc.) and facilitate the factors to reach the targets. Raphides and chitinase also show a strong synergistic lethal effect against insects, which indicated the generality of synergism between raphides and defensive proteins.

raphide (calcium oxalate needle crystal), synergistic defensie function (needle effect), plant defense protein against insects (cysteine protease and chitinase)

発表責任者：今野　浩太郎（konno@affrc.go.jp）

講演番号：4I01-07
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:00～ ミーティングルームⅠ

比較機能解析によるモノテルペン合成酵素の反応制御機構の解明
Elucidation of catalytic mechanisms for monoterpene synthases by comparative functional analyses
○栗栖 尚嗣、角掛 陽、茂木 大介、菊池 洋平、廣森 美樹、和氣 駿之、中山 亨、高橋 征司（東北大工）
○Naotsugu Kurisu, minami Tsunokake, Daisuke Mogi, Youhei Kikuchi, Miki Hiromori, Toshiyuki Waki, Toru Nakayama, Seiji Takahashi (Tohoku Univ.)

自然界に存在する多様な構造のテルペノイドの炭素骨格は，テルペン合成酵素(TPS)と総称される酵素によりプレニル二リン酸を基質として合成される．しかし，TPS における多様な骨格形成の制御機構の詳細は未だ不明である．高等植物のゲノム上には，生成物特異性の異なる多数の TPS パラログがコードされているが，各 TPS の特性は植物種ごとに収斂進化的に形成されたと考えられており，異種植物由来 TPS 間の一次構造比較で生成物特異性決定に重要な残基を見出すことは非常に困難である．そこで本研究では,我々が網羅的に機能同定を進めてきたセイヨウトウキ由来 TPS ファミリー(AaTPS)を対象として，一次配列同一性が高く，かつ生成物特異性の異なる酵素間の比較機能解析を行うことで，TPS における生成物構造制御の基本原理の解明を目指した．まず，AaTPS の 3D モデルを基に基質ポケット形成残基において差異を示す残基を選抜し，部位特異的変異導入を行うことで置換残基の生成物構造制御に対する影響を調査した．一例として，AaTPS2like はα-phellandrene およびその異性体β-phellandrene を 7：3 の割合で合成する一方で，これと 93%の配列同一性を有する AaTPS2 はβ-phellandrene を特異的に合成する．これらの比較解析では基質ポケット形成残基の中で差異が生じている 5 つの残基の内，4 残基を AaTPS2 のものに置換した AaTPS2like 四重置換体においてα体およびβ体が 3：7 の割合で合成され，AaTPS2like の生成物特性を逆転させることに成功した．本発表では，一連の比較機能解析によって導かれた“基質ポケット内部空間の形状に依存した生成物構造制御機構”の可能性とともに，そこから推察される TPS 触媒メカニズムの全容について紹介したい．

The diverse basic carbon skeletons of terpenoids in nature are generated a group of enzymes termed terpene synthase (TPS). The reaction catalyzed by TPS is initiated by release of pyrophosphate from a substrate, prenyl diphosphates, followed by complex rearrangement the resulting allylic cation. However, precise catalytic regulation mechanism of TPS remains to be elucidated. In this study, we aimed to reveal mechanisms for the product structure determination in TPS by comparative functional analysis of TPSs comprehensively identified from *Angelica archangelica*. Enzyme pairs with high sequence identity but different product specificity were selected, and putative key residues, presumed based on comparisons of the primary structures and the 3D models, were substituted to analyze their function in the product structure determination. Based on the results, we propose a regulation mechanism of the product structure depending on the shape of the catalyst pocket.

terpene synthase, terpenoid, structure-function relationship

講演番号：4I01-08
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:00～ ミーティングルーム I

サポジラ（*Manilkara zapota*）由来 *trans* 型プレニルトランスフェラーゼ によるイソプレノイドポリマーの *in vitro* 合成

In vitro biosynthesis of isoprenoid polymers by *trans*-prenyltransferases identified from *Manilkara zapota*

○三輪 幸祐[1]、廣森 美樹[1]、青木 裕一[2]、和氣 駿之[1]、小島 幸治[1]、山下 哲[3]、山口 晴彦[4]、宮城 ゆき乃[4]、戸澤 譲[5]、中山 亨[1]、高橋 征司[1]([1]東北大・院・工、[2]東北大・東北メディカルバンク、[3]金沢大・院・自然科学、[4]住友ゴム工業（株）、[5]埼玉大・院・理工)

○Kosuke MIWA[1], Miki HIROMORI[1], Yuichi AOKI[2], Toshiyuki WAKI[1], Kouji KOJIMA[1], Satoshi YAMASHITA[3], Haruhiko YAMAGUCHI[4], Yukino MIYAGI[4], Yuzuru TOZAWA[5], Toru NAKAYAMA[1], Seiji TAKAHASHI[1] ([1]Grad. Sch. Eng. Tohoku Univ., [2]Tohoku Medical Megabank Tohoku Univ., [3]Grad. Sch. Sci. Tech. Kanazawa Univ., [4]Sumitomo Rubber Ind., Ltd., [5]Grad. Sch. Sci. Eng. Saitama Univ.)

自然界においては、構造が異なる二種類のイソプレノイドポリマーが存在する．一般に天然ゴムと呼ばれる *cis*-1,4-ポリイソプレンを主骨格とするポリマーに対し, *trans*-1,4-ポリイソプレンを主骨格とするポリマーは硬質で弾性が低く，ゴルフボール等に用いられている．*cis* 型ポリマー産生植物に比べ, *trans* 型ポリマー産生植物は少なく，その生合成機構は未解明の点が多い．*trans* 型ポリマー生合成における重合反応は，*trans* 型プレニルトランスフェラーゼ（tPT）の一種で触媒されると推定されていたが，その実態は未解明であった．そこで本研究では，サポジラ（*Manilkara zapota*）における *trans* 型ポリマー合成に寄与する酵素の同定および生合成機構の解明を目的とした．高等植物の tPT との配列類似性を指標に，サポジラのトランスクリプトームデータより二つの候補遺伝子を見出し，*MzTPT1*, *MzTP2* とした．大腸菌内異種発現酵素の機能解析とベンサミアナタバコを用いた細胞内局在性解析より，MzTPT1 は色素体で C_{55} のポリプレニル二リン酸を合成する酵素であることが示された．一方，MzTPT2 は，大腸菌で発現させた際には活性を示さなかったが，無細胞翻訳系を用いてパラゴムノキ由来のゴム粒子に導入することで，分子量 10^3～10^6 のポリイソプレノイドを合成する活性を示した．ベンサミアナタバコで異種発現させた MzTPT2 は，小胞体へ移行されたのち，MzTPT2 の活性依存的に未知の顆粒状構造体を形成することが示された．本研究におけるこれらの結果から，*trans* 型ポリマー合成酵素の同定と，組換え型酵素による *trans* 型ポリマーの *in vitro* 合成に初めて成功した．

In nature, there are two types of polyisoprenoids, *cis*-1,4-polyisoprene and *trans*-1,4-polyisoprene. *trans*-Polyisoprene is a thermoplastic material used in the production of golf balls. The biosynthesis of *trans*-polyisoprene was presumed to be catalyzed by *trans*-prenyltransferase (tPT), but the mechanism had not been elucidated yet. In this study, we aimed to identify the key enzyme responsible for the *trans*-polyisoprene biosynthesis in Sapodilla (*Manilkara zapota*). Based on similarity with the higher plant tPTs, two candidate genes, *MzTPT1* and *MzTPT2*, were found from the assembled transcriptome data of Sapodilla. Functional analyses revealed that MzTPT1 was a plastidial tPT synthesizing C_{55} polyprenyl diphosphate. Meanwhile, MzTPT2 showed distinct activity synthesizing polymers ($Mw=10^3$-10^6) when it was introduced into rubber particles from *Hevea brasiliensis* by means of a cell-free translation system. Heterologous transient expression of MzTPT2 in *Nicotiana benthamiana* resulted in formation of unknown granular structures in the cells. From these results, we succeeded in functional identification of the tPT that could biosynthesize *trans*-polyisopreneoid from Sapodilla.

trans-1,4-polyisoprene, prenyltransferase, rubber particle
発表責任者：高橋　征司（seiji.takahashi.a7@tohoku.ac.jp）

講演番号：4I01-09
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:00～ ミーティングルーム I

ダイズのイソフラボングルコシルトランスフェラーゼの触媒重要残基の検索

Exploring catalytically omportant amino acid residues of a soybean isoflavone glucosyltransferase

○中山 亨[1]、佐藤 誠哉[1]、伊藤 圭介[1]、高橋 征司[1]、和氣 駿之[1]、高橋 厚人[2]、大山 拓次[2]、楠木 正巳[2]、今泉 璃城[3]、山下 哲[3]([1]東北大院工、[2]山梨大院・生命環境、[3]金沢大院・理工)
○Toru Nakayama[1], Tomoya Sato[1], Keisuke Ito[1], Seiji Takahashi[1], Toshiyuki Waki[1], Atsuhito Takahashi[2], Takuji Oyama[2], Masami Kusunoki[2], Riki Imaizumi[3], Satoshi Yamashita[3] ([1]Tohoku Univ., [2]Yamanashi Univ., [3]Kanazawa Univ.)

UDP-グルコース:イソフラボン 7-*O*-グルコシルトランスフェラーゼ（GmIF7GT）は，ダイズイソフラボンのグルコシル化酵素を司る鍵酵素の一つであり，イソフラボンの生理活性調節に重要な役割を果たす．これまでに，植物特化代謝産物のグリコシル化をつかさどる UDP 糖依存性グリコシルトランスフェラーゼ（UGT）の立体構造が多数報告され，GmIF7GT における His15 および Asp125 に対応するアミノ酸残基が触媒重要残基として提案されてきた．このうち，GmIF7GT の His15 に対応する UGT のヒスチジン残基（general acid-base histidine corresponding to His15 of GmIF7GT; GABH-15）は，酵素的グリコシル化における一般酸塩基触媒残基として特に重要であるとされ，GABH-15 を他のアミノ酸に置換することによって UGT 活性がほぼ完全に失われることが数多くの UGT で観察されてきた．一方，ダイズ根から精製した GmIF7GT は，His15 を含めた N 末端側の 49 アミノ酸配列を欠失しているにもかかわらず，全長型の組換え型酵素と同程度の活性を示す．また GmIF7GT の His15 を Ala に置換した変異型酵素の活性は，野生型酵素の値の 17%（k_{cat}）～83%（k_{cat}/K_m）に達する．最近，ヨウシュヤマゴボウのポリフェノール UGT（PaGT2）のミカエリス複合体の結晶構造が明らかにされ，同 UGT はその GABH-15 に対応する His18 とともに His81 も一般酸塩基触媒残基として機能させることができる，ambidextrous（触媒機構的に両手利きの）UGT であることが示された [1]．この結果は，UGT の触媒機構の plasticity（可塑性）を物語るものであり，PaGT2 と同様に GmIF7GT も ambidextrous UGT である可能性が考えられた．この可能性を調べるため，GmIF7GT のミカエリス複合体の結晶構造を 2.2 Å の分解能で決定し，活性部位において一般酸塩基触媒として機能する可能性がある His15 以外のアミノ酸残基を構造的な観点から検索した．またその結果得られた候補アミノ酸残基をアラニンに置換し，得られた変異体酵素の酵素活性や基質特異性を調べた．

GmIF7GT is a UDP-sugar-dependent glycosyltransferase (UGT) that catalyzes the 7-*O*-glucosylation of isoflavones (*i.e.*, daidzein and genistein). We report on the results of X-ray crystallographic and mutational studies of GmIF7GT to identify its catalytically important amino acid residue(s) and discuss possible plasticity of catalytic mechanism of UGTs [1].

[1] Maharjan, R., *et al.*, (2020) *Biochemistry* **24**, 2479-2584.

glucosyltransferase, flavonoid, isoflavone

講演番号：4I01-10
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:00～ ミーティングルーム I

イネ科植物における HCAA 生合成酵素 ACT の解析

Analysis of agmatine coumaroyltransferase involved in HCAA biosynthesis in *Poaceae*

○山根 美代[1]、竹野谷 美穂子[2]、矢嶋 俊介[2]、松島 芳隆[1]、須恵 雅之[1]([1]東京農大・農化、[2]東京農大・バイオ)
○Miyo Yamane[1], Mihoko Takenoya[2], Shunsuke Yajima[2], Yoshitaka Matsushima[1], Masayuki Sue[1]
([1]Dept. AgricChem., Tokyo Univ. Agric., [2]Dept. BioSci., Tokyo Univ. Agric.)

ヒドロキシ桂皮酸類アミド(HCAA)は多くの植物種から見出される植物二次代謝産物であり、大抵の種においてストレス誘導性の耐病性化合物として存在する。しかしオオムギはストレスにさらされたときだけでなく、発芽間もない健康な実生においても HCAA を高濃度に蓄積する。オオムギの主要な HCAA はクマロイルアグマチンとフェルロイルアグマチンであり、これらは agmatine coumaroyltransferase (ACT)の触媒により生合成される。オオムギ *ACT (HvACT1-1)*と 80%以上の高い相同性をもつ遺伝子配列はイネやコムギといったほかのイネ科主要作物にも存在するが、これらの植物における HCAA 蓄積量はオオムギと比べてはるかに低く、なぜオオムギのみが HCAA を多量に蓄積できるのかは明らかになっていない。そこで本研究ではオオムギを中心としたイネ科植物における HCAA 蓄積制御のしくみを解明するために、ACT に着目し植物二次代謝および酵素学的観点から解析をすすめている。

オオムギやコムギ、イネ由来の *ACT* 様遺伝子を、新規のものも含めて複数単離した。これらを大腸菌で異種発現し、*in vitro* 活性を比較したところ、HvACT1-1 はすべての基質に対して最も強い活性を示した。さらにそれぞれの植物中の転写量を解析した結果、*HvACT1-1* の転写量が他と比べて著しく大きいことが分かった。これらの結果より、高活性かつ高発現の ACT の存在はオオムギの高濃度 HCAA 蓄積に寄与しており、特に発現量の大きさにより他のイネ科植物との差別化が生じていると結論した。単離したオオムギおよびコムギ由来 ACT は、基質親和性に明確な違いをもつ 2 つのグループに分けられる。このような活性の違いの構造的要因を明らかにするために、まずは最も高い酵素活性を示した HvACT1-1 の構造を解明した。現在は ACT の基質認識機構を明らかにするために、基質との複合体の構造解析や、変異体の活性評価を試みている。

The accumulation of hydroxycinnamic acid amides (HCAAs) in barley far exceeds that in rice and wheat. However, genes homologous to the HCAA biosynthetic gene *agmatine coumaroyltransferase* in barley are also present in rice and wheat. To explain the large differences in HCAA accumulation among the plants despite their possessing homologous HCAA-biosynthetic genes, we are focusing on ACTs and analyzing them from the perspective of plant secondary metabolism and enzymology. Several orthologs and paralogs of the barley *ACT (HvACT*) were cloned from barley, wheat and rice. Quantification of transcript levels and functional analysis of recombinant ACTs suggested that the presence of highly active and highly expressed ACT contributed to the high concentration of HCAAs in barley. In addition, the structure of HvACT1-1 was elucidated to gain insight into the structure-activity relationship of ACTs.

Hordeum vulgare, enzyme, secondary metabolism

講演番号：4I01-11
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:00～ ミーティングルーム I

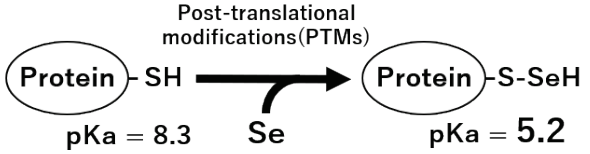
Se 存在下での GAPC 活性強化は GSH を介した翻訳後修飾による Se 結合に起因する

Enhancement of GAPC activity in the presence of Se results from Se binding by post-translational modifications via GSH

○高貝 俊生[1]、小嵜 光夏[2]、武田 徹[1,2] ([1]近畿大院農、[2]近畿大農)
○Toshiki TAKAGAI[1], Mitsuka KOZAKI[2], Toru TAKEDA[1,2] ([1]Grad Kindai., [2]Kindai Univ.)

ヒトや動物における必須微量元素であるセレン（Se）は、植物においては必須の元素ではない。しかし、微量の Se は遺伝子発現量の調節を介した環境ストレス耐性の強化や生育促進などの有用性を植物にもたらすことから、Se は植物における有用元素であると認識されている。これらの背景から、作物生産や環境浄化において植物における Se 動態やその制御に関する知見の活用が期待されている。

我々は、ブロッコリー（*Brassica oleracea var. italica*）を 100 μM の Se 酸存在下で栽培した際に、細胞質型グリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素（GAPC）に Se が結合し、それに伴って酵素活性が増加することを明らかにした。また、*in vitro* での翻訳後修飾による GAPC への Se 結合を検証した結果、グルタチオン（GSH）を介した反応によって 1.0 mol の GAPC に対し 3.8 mol の Se が結合することが確認され、Se 結合型 GAPC 活性は Se 結合前と比べ 1.66 倍増加していた。Se 存在下における GAPC 活性の増加は、活性中心のチオール基(-SH, pKa=8.3)が Se による翻訳後修飾を受け、より求核反応性の高いセレノール基(-SeH, pKa=5.2)が生成されることが原因であると推測されるが、現段階では、GAPC における Se 結合部位とその結合形態は不明であり、現在、解析を進めている。以上の結果より、我々はタンパク質への翻訳後修飾による Se 結合を介した機能改変は植物における Se 有用性発現機構もしくは Se 動態制御機構の一部であると考察している。



Selenium (Se) is not necessary for growth of higher plants. However, a small amount of Se have a positive effect on plant growth and environmental stress tolerance such as heavy metal, drought and pathogen through regulation of gene expression. We demonstrated that Se binding by post-translational modification to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPC), both *in planta* and *in vitro*, and the resulting enhancement of enzyme activity. Reaction of GAPC and selenite with GSH in vitro revealed that 3.8 mol of Se binds to 1.0 mol of GAPC and the activity of Se-bound GAPC increases 1.66 times that before Se binding. In Se-bound GAPC, the thiol group at the active center is converted to a selenol group with higher nucleophilic reactivity, which is presumed to be involved in the increase in activity. However, the Se binding form in GAPC is unknown, and analysis is currently in progress.

Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, Selenium, post-translational modifications

発表責任者：高貝俊生（2044690001u@nara.kindai.ac.jp）

講演番号：4I01-12
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:00～ ミーティングルーム I

多剤不活性化酵素 HIS1 およびそのホモログの新たな代謝基質の発見とその解析

Discovery of a novel substrate for multi-herbicide-inactivating enzyme HIS1 and its homologues

○親松 紗璃依[1]、山崎 明彦[2]、酒井 基成[2]、廣瀬 咲子[3]、大島 正弘[3]、黒木 慎[3]、戸澤 譲[1]([1]埼玉大院理工、[2](株)エス・ディー・エス バイオテック、[3]農研機構)
○ Sarii OYAMATSU[1], Akihiko YAMAZAKI[2], Motonari SAKAI[2], Sakiko HIROSE[3], Masahiro OSHIMA[3], Makoto KUROKI[3], Yuzuru TOZAWA[1] ([1]Saitama Univ., [2]SDS biotech, [3]NARO)

我々は，イネ由来の多剤抵抗性遺伝子 *HIS1* が，2-oxoglutarate/Fe(II) dependent dioxygenase (2OGD) ファミリーに属する酵素をコードすることを報告した(Maeda *et al.*, Science 365, 2019)．その後，既知の 2OGD 阻害剤による HIS1 活性への影響を調査する過程で，ジベレリン生合成阻害剤 Trinexapac-ethyl (TE)が HIS1 により代謝されることを見出し，これまでに特定部位が水酸化修飾された TE 代謝物の構造を決定している．さらに，TE がイネ実生に顕著な生育阻害を示すのに対し，この水酸化化合物(TE-OH)による阻害効果は極めて低いことを確認した．我々は次に 10 種類の HIS1 類似タンパク質 HSL に対して TE 代謝能を検証した．その結果，イネの OsHSL2 および OsHSL4，コムギの TaHSL1 および TaHSL2，オオムギの HvHSL6A にそれぞれ TE 代謝活性を確認した．一方，HIS1 と 86%相同な OsHSL1 は TE 代謝能を示さず，TE は弱いながらも OsHSL1 触媒機能に対する阻害活性を示した．構造予測モデルに基づく推定基質認識部位のアミノ酸置換変異体の作製および活性解析の結果，OsHSL1 の３アミノ酸残基の HIS1 型への置換が，HIS1 と同程度の TE 代謝活性を付与することを確認した．これらの結果は，HSL 群が広い基質特異性を有し，新たな薬剤代謝酵素として分子デザイン可能な潜在的有用性を持ち合わせていることを示している．

Multi-herbicide resistance gene, *HIS1*, encodes an enzyme that belongs to 2-oxoglutarate/Fe(II) dependent dioxygenase (2OGD) family. During the test of 2OGD inhibitors, we found that HIS1 metabolizes a Gibberellin biosynthesis inhibitor, Trinexapac-ethyl (TE), and determined the structure of the metabolites as a hydroxylated form of TE (TE-OH). Based on rice seedling growth tests, we observed that TE represses seedling growth, but TE-OH barely represses the seedling growth. We further explored the TE-metabolizing activity of other 10 HIS1-like proteins (HSLs) and found that rice OsHSL2 and OsHSL4, wheat TaHSL1A and TaHSL2, and barley HvHSL6A have a similar activity. On the other hand, OsHSL1, which shares 86% identity with HIS1, exhibited no such activity. We observed that TE, in turn, slightly affects the catalytic activity of OsHSL1. We next built structure models of HIS1 and OsHSL1 and performed amino acid substitution analysis of OsHSL1. Results revealed that three amino acid substitutions in OsHSL1 to that of HIS1-type confers TE-metabolizing activity to OsHSL1. Our results showed broad substrate specificity of HSLs and the potential usefulness of the enzymes for xenobiotic metabolism.

2-oxoglutarate/Fe(II) dependent dioxygenase, rice, enzyme

発表責任者：戸澤譲（tozawa@mail.saitama-u.ac.jp）

講演番号：4I01-13
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:00～ ミーティングルーム I

植物葉における KODA 生産のための技術基盤の構築

Engineering the production of KODA in Arabidopsis leaves

○若松 孝幸[1]、井原 雄太[1,2]、横山 峰幸[3]、前澤 大介[2,4]、太田 啓之[1,2]、下嶋 美恵[1,2]（[1]東京工業大学, 生命理工学院、[2]OPERA, JST、[3]東京農工大学大学院, 農学研究院、[4]癸巳化成株式会社）
○Takayuki WAKAMATSU[1], Yuta IHARA[1,2], Mineyuki YOKOYAMA[3], Daisuke MAEZAWA[2,4], Hiroyuki OHTA[1,2], Mie SHIMOJIMA[1,2] ([1]School of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology, [2]OPERA, JST, [3]International Environmental and Agricultural Sciences, Tokyo University of Agriculture and Technology, [4]Kishi Kasei Co., Ltd.)

植物の二次代謝産物であるオキシリピンは、防御応答や成長調節に関わる生理活性物質であることが知られている。オキシリピンの一種である 9,10-α-ketol octadecadienoic acid（KODA）は、9-リポキシゲナーゼ（LOX）およびアレンオキシドシンターゼ（AOS）により α-リノレン酸から合成され、開花、発根やストレス回復に寄与することがこれまでに報告されており、将来的には農業での利用が期待できる。しかし、これまでに植物を用いた安定的で高効率な KODA の生産方法は確立されていない。

本研究では、KODA 生合成の基質である α-リノレン酸を豊富に含む植物葉に着目し、アオウキクサの KODA 高生産株の *LOX* および *AOS* をシロイヌナズナに導入することで、KODA を高生産する方法を確立した。シロイヌナズナにおいて、上記の LOX および AOS を局在化配列なしに過剰発現させたところ、形質転換体を得ることはできなかった。しかし、LOX および AOS に葉緑体局在配列を付加して過剰発現させたところ、KODA を高生産する形質転換体が得られた。この結果より、植物の種子形成または発芽初期における LOX および AOS の細胞質における過剰発現は、生育を阻害する可能性が示唆された。また、植物葉における KODA 生産においては、両酵素タンパク質の葉緑体への封じ込めが必要であることが示唆された。

In plants, oxylipin is one of the second metabolites and physiologically active substances, which is known to be involved in defense response and growth control. KODA (9,10-α-ketol octadecadienoic acid) is one of the oxylipins, that is synthesized from α-linolenic acid by 9-lipoxygenase (LOX) and allene oxide synthase (AOS). Since it was previously reported that KODA contributes to flowering induction and stress tolerance, it has been expected to be applied to agriculture for improving the yield. However, a stable, efficient and costless method of KODA production has not been established yet.

Here, we focused on plant leaves which contain large amounts of α-linolenic acids, the substrates for KODA synthesis. We introduced *Lemna LOX* and *AOS* into Arabidopsis to produce LOX/AOS-overexpressing transformants, but the transformants were not isolated. However, when LOX and AOS with chloroplast transit peptide were introduced into Arabidopsis, we could obtain the stable transformants which produced a large amount of KODA and grew similarly to wild-type plants. From these results, it was suggested that overexpression of LOX/AOS in chloroplasts is important for producing KODA in plant leaves.

KODA, oxylipin, plant leaves

発表責任者：下嶋美恵（shimojima.m.aa@m.titech.ac.jp）

講演番号：4I01-14
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:00～ ミーティングルーム I

esp2 突然変異を導入した水稲系統における米粉特性と種子貯蔵成分と遺伝子発現の変化

Rice flour characteristics, grain compounds and gene expression analysis of the seed storage protein mutation *esp2* in different genetic backgrounds.

○堀 清純[1]、飯島 健[1]、朱 紅加[1]、小山 翔大[2]、小澤 佳祐[2]、辻井 良政[2]、山本 敏央[1,3]、熊丸 敏博[4]、奥西 智哉[5]([1]農研機構・作物開発セ、[2]東京農大応生・農化、[3]岡山大・植物、[4]九州大・院農、[5]農研機構・食品研)
○Kiyosumi HORI[1], Ken IIJIMA[1], Koka SHU[1], Shota KOYAMA[2], Keisuke OZAWA[2], Yoshimasa TSUJII[2], Toshio YAMAMOTO[1,3], Toshihiro KUMAMARU[4], Tomoya OKUNISHI[5] ([1]NICS, NARO, [2]Tokyo Agr. Univ., [3]Okayama Univ., [4]Kyushu Univ., [5]NFRI, NARO)

イネの *esp2* 変異体は、タンパク質ジスルフィドイソメラーゼ（PDI）の 1 つが欠損して種子貯蔵タンパク質のグルテリン前駆体等が高蓄積する。*esp2* 変異を導入した多収品種オオナリの交配後代系統（オオナリ *esp2* 系統）と比較して、主食用品種コシヒカリの系統（コシヒカリ *esp2* 系統）では優れた米粉特性を示した。本研究では、2 つの *esp2* 系統の米粉特性の違いの原因を明らかにするために、種子貯蔵タンパク質の組成や合成遺伝子群の発現を調査した。

コシヒカリ *esp2* 系統とオオナリ *esp2* 系統の両方において、グルテリン前駆体が多量に蓄積していた。コシヒカリ *esp2* 系統では、製粉時に平均粒度が小さく損傷デンプンが少なく、製パン（米粉 30%小麦粉 70%）時にパン体積が大きくなる傾向が観察された。しかし、オオナリ *esp2* 系統では、これらの製粉加工適性の変化は小さくなっていた。種子貯蔵タンパク質合成遺伝子の発現解析の結果、コシヒカリ *esp2* 系統では一部の *PDI* や *BiP* が高発現していたが、オオナリ *esp2* 系統では変化は観察されなかった。分画抽出したタンパク質電気泳動の結果、エタノール、酢酸、SDS、DTT において低分子領域のバンド強度が低減した。コシヒカリ *esp2* 系統では、*esp2* 以外の *PDI* や *BiP* の発現上昇により種子貯蔵タンパク質の高分子複合体が形成されて、製粉加工適性が向上している可能性が考えられる。従って、*esp2* 変異による米粉特性の変化は、品種の違いに影響を受けることが示唆された。

本研究はイノベーション創出強化研究推進事業および SIP スマートバイオ産業・農業基盤技術の支援を受けて実施した。

Deficient mutation of *Protein Disulfide Isomerase 1-1* (*PDI1-1*) causes large amount of accumulation of glutelin precursor, which is one of seed-storage proteins in rice. We introduced the same mutation allele of *PDI1-1* in different genetic backgrounds of two rice cultivars ‘Koshihikari’ and ‘Oonari’, and evaluated their phenotypes for grain components and food processing suitability. Both two mutant lines expressed similar contents such as protein, amylose and low molecular weight compounds. However, the ‘Koshihikari’ mutant line acquired high quality of rice flour and food processing characteristics such as rice bread, while the ‘Oonari’ mutant line slightly improved these traits. We compared mRNA expressions of *PDI*, *Ero1* and *Bip* family genes and accumulations of other seed storage proteins between the ‘Koshihikari’ and ‘Oonari’ mutant lines.

Rice flour, Seed storage protein, Gene expression

発表責任者：堀　清純（horikiyo@affrc.go.jp）

講演番号：4I01-15
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:00～ ミーティングルームⅠ

枝作り酵素（BE）IIb 変異体にインディカ米由来の遺伝子を導入した#1203 系統の戻し交配による農業形質の向上と胚乳澱粉の特性解析

Improvement of agricultural traits by backcrossing #1203 rice lines, which lack starch branching enzyme (BE) IIb but have genes derived from indica rice, and analyses of their endosperm starch properties.

○三浦 聡子、成田 真衣子、伊藤 優季、クロフツ 尚子、保坂 優子、追留 那緒子、阿部 美里、藤田 直子（秋田県大　生物資源）
○Satoko MIURA, Maiko NARITA, Yuki ITOH, Naoko CROFTS, Yuko HOSAKA, Naoko Oitome, Misato ABE, Naoko FUJITA (Akita Pref. Univ.)

難消化性澱粉（レジスタントスターチ：RS）は消化されにくく、高分子のまま大腸に到達するため整腸作用や血糖値上昇抑制効果があり、糖尿病予防などが期待されている。米澱粉の主成分であるアミロペクチンの合成に重要な枝作り酵素（*BE*）*IIb* が欠損した変異体米（*be2b*）の澱粉構造は、通常の米と比べてアミロペクチン長鎖の割合が多く、RS 含量が激増することが知られている。更に RS 含量が高い米を作出するため、*be2b* にインディカ米由来の活性型*スターチシンターゼ（SS）2a* を導入した#1203A 系統、高発現型の*澱粉粒結合型（GB）SS1* を導入した#1203B 系統、活性型 *SS2a* と高発現型 *GBSS1* の両方を導入した#1203C 系統を作出したのち、農業形質改善のため、超多収品種と戻し交配を行った。これらのうち、#1203B-BC_3 と#1203C-BC_3 の農業形質及び胚乳澱粉特性解析を行った。

#1203B-BC_3 と#1203C-BC_3 は戻し交配前と比べて開花日が 8 月中～下旬から 7 月下旬～8 月初旬に早まった。澱粉構造は戻し交配前後でほとんど変化はなかった。すりつぶした炊飯米の RS 含量は *be2b*-BC_3 の 7.2%より高く、#1203B-BC_3 が 10.0～11.0%、＃1203C-BC_3 が 14.1～17.2%だった。米粉の RS 含量は#1203B-BC_3 では *be2b*-BC_3 の 24.9%と同程度であったが、#1203C-BC_3 は 31.7～40.6%と高かった。従って *be2b* に *GBSS1* あるいは、これと *SS2a* の導入によって RS 含量が増加することが明らかとなった。

Resistant starch (RS) is not easily digested and reaches to large intestine as polymer. Therefore, it improves colon environment and suppresses blood glucose levels, and is expected to prevent diabetes. Synthesis of amylopectin, the major component of starch, requires *starch branching enzymes* (*BE*) *IIb*. In *be2b* japonica rice, proportion of long amylopectin chains and RS content had drastically increased. To further increase RS content, following genes were introduced from indica rice into *be2b*, and named #1203; 'A' lines, active *starch synthase* (*SS*) *2a*; 'B' lines, high expression of *starch granule-bound* (*GB*) *SS1*; 'C' lines, both *SS2a* and *GBSS1*. These lines were backcrossed with a high-yield variety, and agricultural traits and starch properties were analyzed.

Flowering date of the backcross lines, #1203B-BC_3 and #1203C-BC_3, became two weeks earlier, but their starch structure was essentially unchanged. The RS content of mashed cooked rice was 10.0-11.0% and 14.1-17.2% for #1203B-BC_3 and #1203C-BC_3, respectively, while that of *be2b*-BC_3 was 7.2%. The RS content of rice flour in #1203B-BC_3 was 24.9%, which was the same level as that of *be2b*-BC_3, but that of # 1203C-BC_3 was much higher (31.7-40.6%). Therefore, it is clear that introducing high expression type *GBSS1* alone and high expression type *GBSS1* together with active *SS2a* into *be2b* japonica rice mutant can further increase the RS content of rice.

rice, resistant starch, agricultural traits

発表責任者：藤田　直子（naokof@akita-pu.ac.jp）

講演番号：4I01-16
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:00～ ミーティングルーム I

植物における一体型ベクターを利用した CRISPR/Cas9 による標的切断誘導的なジーンターゲッティング系の確立
Precise genome editing via CRISPR/Cas9-mediated gene targeting using an all-in-one vector in plants
○横井 彩子[1,2]、三上 雅史[1]、土岐 精一[1,3]([1]農研機構・生物研、[2]JST・さきがけ、[3]横浜市大・木原生研)
○Ayako NISHIZAWA-YOKOI[1,2], Masafumi MIKAMI[1], Seiichi TOKI[1,3] ([1]NIAS, NARO, [2]PRESTO, JST, [3]Kihara Inst. Biol. Res.)

標的組換え（ジーンターゲッティング、GT）は、標的遺伝子上に生じた DNA 二重鎖切断（DSBs）を相同組換えによって修復する際に鋳型 DNA 上の任意の変異を標的遺伝子上に導入できることから、望み通りに標的を改変できる精密なゲノム編集技術である。従って、機能獲得型変異体の作出には不可欠な技術であるが、その効率の低さゆえ、様々な作物種に適用可能な GT 技術の確立は困難であった。

本発表では、シンプルで簡便な一体型ベクターを用いた CRISPR/Cas9 による DSB 誘導的 GT 系により、イネおよびタバコの内在性の標的遺伝子の改変例について紹介する（Nishizawa-Yokoi et al., 2020）。この方法は、標的遺伝子を切断するガイド RNA および Cas9 発現カセット、選抜マーカー、GT の鋳型配列を一つのベクター上に配置した一体型ベクターをイネカルスあるいはタバコ葉片にアグロバクテリウムを介して形質転換し、抗生物質耐性カルスにおいて GT に成功したカルスを選抜した。動物細胞で GT 効率を向上させることが知られている RS-1（Rad51-stimulatory compound 1）処理条件下において、0.2%の効率で標的遺伝子に目的の改変を導入することができた。現在、GT 効率を向上させる化合物の探索や鋳型 DNA の供給方法の工夫により、GT 系のさらなる効率化を試みている。

Gene targeting (GT) is a precise genome engineering technique that enables the introduction of desired mutations into target genes through homologous recombination between the host genome and GT donor template. We have developed a universal system of CRISPR/Cas9-mediated GT using an all-in-one vector comprising a CRISPR/Cas9 expression construct, selectable marker and GT donor template, and have applied this system to introduce point mutations with non-selectable traits into endogenous target genes in rice and tobacco. Among rice calli transformed with the all-in-one vector, 0.2% were GT-positive under treatment with RS-1 (Rad51-stimulatory compound 1)- a regulatory molecule that has been utilized to improve GT frequency in mammalian cells. Similar results were obtained in tobacco. We are attempting to improve GT efficiency by treatment with other chemicals and/or by increasing delivery efficiency of the GT template.

Nishizawa-Yokoi et al. (2020) A universal system of CRISPR/Cas9-mediated gene targeting using all-in-one vector in plants. Front. Genome Ed. (doi:10.3389/fgeed.2020.604289)

Gene targeting, Genome editing, CRISPR/Cas9

発表責任者：横井彩子（ayokoi@affrc.go.jp）

講演番号：4I03-01
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:00～ ミーティングルーム I

トマト根が分泌するトマチンによる根圏細菌叢の制御
Regulation of the bacterial communities in the rhizosphere by tomatine secreted from tomato roots
○中安 大[1]、大野 滉平[1]、高松 恭子[1]、青木 裕一[2]、山﨑 真一[2]、髙瀬 尚文[3]、庄司 翼[4,5]、矢﨑 一史[1]、杉山 暁史[1]([1]京都大・生存研、[2]東北大・ToMMo、[3]京都先端大・バイオ環境、[4]奈良先端大・バイオサイエンス、[5]理研・CSRS)
○ Masaru NAKAYASU[1], Kohei OHNO[1], Kyoko TAKAMATSU[1], Yuichi AOKI[2], Shinichi YAMAZAKI[2], Hisabumi TAKASE[3], Tsubasa SHOJI[4,5], Kazufumi YAZAKI[1], Akifumi SUGIYAMA[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Tohoku Univ., [3]KUAS, [4]NAIST, [5]RIKEN)

植物は一次代謝産物や特化代謝物（二次代謝産物）などを根から分泌し、根周辺の土壌領域に生育する根圏微生物に影響を与える。根圏微生物は植物の生長や病害抑制に重要な役割を担っている。近年、根圏微生物叢を制御する植物特化代謝物が複数報告されている。特化代謝物の 1 種であるサポニンは界面活性作用を有し、高等植物に広く分布する生物活性物質である。これまでにダイズ(*Glycine max*)とトマト(*Solanum lycopersicum*)が、それぞれソヤサポニンとトマチンを根から分泌することを明らかにした（Tsuno *et al,* 2018；大野ら、本学会 2019 年度大会)。また、トマチン標品の添加が土壌の細菌叢を変化させることを見出した(中安ら、本学会 2020 年度大会)。本研究では、圃場栽培トマト根圏土壌および根から離れたバルク土壌の細菌叢解析を行った。スフィンゴモナス科がトマチン標品添加とトマト根圏で共通して増加した。また、根におけるスフィンゴモナス科の特定のグループが野生型よりもトマチン低生産変異体 *jre4-1* で少なかった。以上の結果から、トマトは根からのトマチン分泌により根圏微生物叢を調節することを明らかにした。トマトがスフィンゴモナス科を増加させる生物学的意義を見出すため、トマト根由来の単離株を用いてトマト生育への影響の評価を進めている。

Plant roots secrete primary and specialized metabolites and affect soil-borne microbes in the rhizosphere. Rhizosphere microbes play important roles in plant growth and disease resistance. Recently, several plant specialized metabolites have been reported to be involved in assembly of root-associated microbiota. Saponins, a group of specialized metabolites widely distributed in higher plants, have a diverse range of biological activities. Previous works revealed that soybean and tomato secrete soyasaponin and tomatine, respectively. The treatment with authentic tomatine changed the bacterial communities in soil. In this study, we analyzed the communities in bulk and rhizosphere soil of field-grown tomato. Sphingomonadaceae increased in the tomato rhizosphere as well as tomatine-treated soil, and higher occurrence of its specific group was seen in roots of wild-type than in those of *jre4-1*, a mutant with low tomatine production. These results revealed that tomato controls root-associated microbiota by tomatine secretion.

tomato, rhizosphere, tomatine

発表責任者：中安　大（masaru_nakayasu@rish.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：4I03-02
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:00～ ミーティングルーム I

水耕栽培と圃場栽培トマトの比較によるトマチン生合成及び分泌の解析

Analysis of tomatine biosynthesis and secretion using tomato grown in a hydroponic system and field

○高松 恭子[1]、中安 大[1]、山﨑 真一[2]、青木 裕一[2]、永野 惇[3]、高瀬 尚文[4]、庄司 翼[5,6]、矢﨑 一史[1]、杉山 暁史[1]([1]京都大・生存研、[2]東北大・ToMMo、[3]龍谷大農、[4]京都先端大・バイオ環境、[5]奈良先端大・バイオサイエンス、[6]理研・CSRS)
○Kyoko TAKAMATSU[1], Masaru NAKAYASU[1], Shinichi YAMAZAKI[2], Yuichi AOKI[2], Atsushi NAGANO[3], Hisabumi TAKASE[4], Tsubasa SHOJI[5,6], Kazufumi YAZAKI[1], Akifumi SUGIYAMA[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Tohoku Univ., [3]Ryukoku Univ., [4]KUAS, [5]NAIST, [6]RIKEN)

根圏は植物根から影響を受ける土壌領域である。植物の根から分泌される代謝産物は根圏微生物の誘引や忌避等、植物-微生物間相互作用において多様な機能を担う。トマト（*Solanum lycopersicum*）は、ステロイド配糖体であるトマチンを蓄積する。これまで水耕栽培及び、圃場栽培トマトの根からトマチンが分泌されること、トマチンが根圏微生物叢を変化させることを明らかにした（大野ら、本学会 2019 年度大会；中安ら、本学会 2020 年度大会）。一方で、根圏微生物が植物代謝産物の生産や分泌に与える影響は十分に理解されていない。本研究では、水耕栽培、及び、圃場栽培のトマトを用いて、トランスクリプトーム解析や、トマチンの生合成と分泌に関する生化学的解析を行うことにより、栽培環境の違いがトマチン生合成と分泌に与える影響を評価することを目的とした。

LC-MS 分析によりトマチンを定量した結果、野生型と *jre4-1* 変異体の両方において、根におけるトマチン量は水耕に比べて圃場栽培で高かった。この結果は、土壌微生物が JRE4 を含む複数の転写因子を介してトマチン蓄積量を増加させることを示唆した。現在、水耕と圃場栽培の両条件において RNA-seq による遺伝子発現解析を進めている。

Rhizosphere is the soil area affected by plant roots. Metabolites secreted from the roots have various functions in plant-microbe interactions such as attracting and repelling soil microbes. Tomato (*Solanum lycopersicum*) accumulates tomatine, a steroidal glycoalkaloid. Our previous studies demonstrated that tomatine is secreted from both hydroponic- and field-grown tomato roots, and it alters bacterial communities in the rhizosphere (Ohno et al., the 2019 annual meeting of JSBBA; Nakayasu et al., the 2020 annual meeting of JSBBA). However, the effects of rhizosphere microbes on plant metabolites are still uncovered. In this study, to evaluate the effects of the different cultivation conditions on tomatine biosynthesis and secretion, transcriptome, tomatine biosynthesis and secretion were analyzed both in hydroponic- and field-grown tomatoes. The amount of tomatine in roots was higher under field condition than hydroponic condition in both wildtype and *jre4-1* mutant, suggesting that rhizosphere microbes increase tomatine accumulation via multiple transcription factors including JRE4. Comparative transcriptional analysis between hydroponic- and field-grown tomatoes is underway.

tomato, rhizosphere, tomatine

発表責任者：高松恭子（takamatsu.kyoko.48w@st.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：4I03-03
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:00～ ミーティングルーム I

土壌環境の違いが非根圏、根圏、および根内における細菌に及ぼす影響の解析

Analysis of the influence of soil environment on bacteria in root, rhizosphere, and non-rhizosphere soil

○坪倉 美紗、荒木 希和子、久保 幹（立命館大生命）
○Misa TSUBOKURA, Kiwako S. ARAKI, Motoki KUBO (Ritsumeikan Univ.)

植物は滲出物などの種類や量を調節し、植物生育を促進する微生物を選択的に増殖させることができる。また、微生物は植物のみの影響を受けるのではなく、土壌環境の違いによっても大きく変化する。このように、植物、土壌、微生物は複雑に影響しあい、互いに有利な条件となるように共生しているが、農薬や化学肥料が多用される環境では、この相互作用は機能しにくくなっていると考えられる。本研究では、非根圏、根圏、根内の細菌数の定量によって階層的に解析を行い、施肥の違いによって異なる土壌環境が植物根周辺の細菌に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。まず、同じ土壌に有機肥料および化学肥料をそれぞれ施肥し、作製した有機土壌と化学土壌を用いて、コマツナを種子から栽培した。栽培 5 週目に、非根圏および根圏から土壌を採取し、収穫したコマツナの根は表面殺菌を行い、乳鉢で圧搾処理を行った。その後、これらサンプルから Slow-stirring 法によって DNA を抽出し、非根圏、根圏、根内における細菌数の定量を行った。更に同じ DNA 抽出液を用いて、PCR-DGGE 分析を行い、細菌叢の解析も行った。結果、有機土壌の非根圏および根圏における細菌数は、それぞれ 9.9×10^8 cells/g-soil、3.2×10^8 cells/g-soil であったが、化学土壌では、n.d.（6.6×10^6 cells/g-soil 以下）であった。非根圏および根圏における細菌数は条件間で違いが見られ、施肥によって土壌環境は大きく異なっていた。根内の細菌数は、化学土壌で非根圏および根圏における細菌数は検出限界以下.にも関わらず、有機土壌で栽培したものよりも多かった（6.4×10^8 cells/g、4.2×10^8 cells/g）。PCR-DGGE 分析結果を比較すると、非根圏および根圏における細菌叢は、施肥によって大きく異なっていたが、根内における細菌叢は施肥による違いは認められなかった。これら結果から、有機土壌に比べて、化学土壌で栽培したコマツナの根内に多くの細菌が生息していることが考えられた。

To understand the effect of soil environment to microorganisms around plant root, bacterial biomass and diversity in non-rhizosphere, rhizosphere and intra-root were analyzed. *Brassica rapa* var. *perviridis* was cultivated with organic and chemical soils for 5 weeks. The bacterial biomass in non-rhizosphere, rhizosphere and intra-root with the organic soil were gradually decreased (9.9×10^8, 3.2×10^8, 4.2×10^8 cells/g, respectively), but those with the chemical soil were reversed (n.d., n.d., 6.4×10^8 cells/g). The bacterial diversity in the same experiment showed same tendency. Comparing organic soil with chemical soil, the bacterial biomass and diversity in non-rhizosphere and rhizosphere were quite different, but the band positions of PCR-DGGE analysis of intra-root were resemble.

Rhizosphere, Bacteria, Soil

講演番号：4I03-04
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:00～ ミーティングルーム I

有機資材がネコブ病発症に与える抑制効果の解析

Analysis of the suppressive effects of organic materials on clubroot disease

○雲川 雄悟、荒木 希和子、久保 幹（立命館大生命）
○Yugo KUMOKAWA, Kiwako S. ARAKI, Motoki KUBO (Ritsumeikan Univ.)

【背景・目的】農業現場において、植物病害は作物の収量を大きく減少させる要因の一つである。植物病を引き起こす病原体は土壌中に多種類存在しており、細菌をはじめ、糸状菌、そして原生動物などの微生物が挙げられる。病原体を除去する方法として、殺菌成分を含む農薬を使うことが主流であるが、有機物の添加によって土壌環境を改善し植物病を防除する方法も試みられている。これは、土壌に有機物を添加することで微生物種が増えて活性化し、拮抗微生物の増加により病原菌の働きを抑制する手法である。本研究では植物病のネコブ病発症を指標とし、土壌改良や植物成長に効果をもたらす有機資材がネコブ病発症に与える効果を解析することを目的とした。
【方法・結果】ネコブ病を発症したコマツナ根からネコブ病菌（*Plasmodiophora brassicae*）の休眠胞子を抽出し、休眠胞子懸濁液を作製した。コマツナ（*Brassica rapa*）を、ネコブ病菌休眠胞子が 5.0×10^4 胞子/mL-soil 含んだ土壌（病土）に定植し、植物栽培室で栽培した。土壌は、化学肥料のみを添加した化学土壌と有機肥料のみを添加した有機土壌を使用し、さらに各土壌に木酢液を 0.1%もしくは 0.5% w/w の量で添加した実験も行った。コマツナを収穫後、ネコブ病発病指数（DI）と植物個体の重量の測定および内生菌について解析した。

栽培 4 週目のコマツナの根を観察すると、有機物を多く含む環境の土壌で栽培したコマツナは、化学肥料を添加した化学的環境に比べて、発病指数が 1/3 ほど低くネコブ病が抑制されていた。また木酢液添加の有無によってネコブ病の発病指数に大きく違いが見られた。化学土壌では、木酢液 0.5%の添加によってネコブ病の発病指数が最大で 1/4 まで減少し、植物地上部の収量増加も確認できた。有機土壌においても同様に、木酢液 0.5%を添加した場合ではほとんどの株でネコブ病発症が抑制されていた。これらの結果から、有機土壌環境や木酢液はネコブ病の発症を抑制する効果を有していることが示唆された。

Plant disease is one of the biggest causes to decrease the agricultural harvest, such as clubroot disease. This research aims to analysis the effects of organic materials to suppress clubroot disease. Wood vinegar that is kinds of organic materials has suppressive effects and disease index of *Brassica rapa* clubroot disease was decreased.

Clubroot disease, Organic materials, Wood vinegar

講演番号：4I03-05
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:00～ ミーティングルーム I

大豆発芽時の植物－微生物間生存競争における種子からの抗菌性酢酸の生成

Antibacterial acetic acid synthesis in the seeds during plant-microbe competition upon soybean germination

○長瀬 鮎美、杉浦 春香、渡辺 大輔、橋本 渉（京大院農）
○Ayumi NAGASE, Haruka SUGIURA, Daisuke WATANABE, Wataru HASHIMOTO (Kyoto Univ.)

【目的】植物種子には発芽のための豊富な栄養素が含まれている。これらは種子の周囲に存在する微生物にとっても利用可能である。植物と微生物の生育がせめぎ合う発芽中の種子において、植物はどのように微生物の生育・侵入を防ぐのだろうか。当研究室では、納豆菌 *Bacillus subtilis* (natto)が、発芽能を有し生きている大豆（生命体）上では生育抑制を受けるのに対し、蒸し大豆などの枯死体上で良好に生育することを明らかにしている[1]。これまでに生大豆における抗菌活性物質の存在を見出しているため、本研究では生大豆による納豆菌の生育抑制メカニズムを明らかにすることを目指した。
【結果と考察】抗菌活性を示す生大豆由来酢酸エチル抽出物に対して分液操作を行い、得られた強活性画分を GC-MS 解析に供したところ、その主成分は酢酸と同定された。生大豆は吸水から 24～48 時間後に発芽を始め、顕著に納豆菌の生育を抑制し、同時期に酢酸含量も上昇した。また、複数の菌種を用いた解析では、抽出物および酢酸が植物病原菌 *Agrobacterium tumefaciens* に対して強い抗菌活性を示した。以上の結果より、生大豆は発芽時に酢酸を生成することで近傍の微生物の生育を抑制し、必要な栄養分を微生物から守ると考えられる。近年、乾燥ストレスに晒されたシロイヌナズナにおいて酢酸合成経路遺伝子の発現が誘導されることが報告されているが[2]、本研究により、発芽時に種子から生成される酢酸が植物病原菌の生育を直接的に抑制することが新たに示され、酢酸生成が植物-微生物間生存競争において植物に有利に働く可能性が見出された。

【Purpose】During germination of plant seeds, plants and bacteria conflict for available nutrients. How do plants inhibit growth and invasion of bacteria? We have previously reported that growth of *Bacillus subtilis* (natto) is suspended on live soybeans (a.k.a. *Glycine max*), although progressed on dead soybeans[1]. Here we focused on the components in soybean extracts that inhibited the *B. subtilis* growth.
【Results and Discussion】GC-MS analysis identified acetic acid as a major growth inhibitor produced upon germination of soybeans. Soybean extracts or acetic acid strongly inhibited the growth of plant pathogens, such as *Agrobacterium tumefaciens*. Based on these results, live soybeans may emit acetic acid to restrict adjacent bacterial growth and save nutrients for themselves. *Arabidopsis thaliana* induces the expression of the acetic acid synthetic pathway genes upon drought stress[2]. Acetic acid may protect new-born plants at germination by directly inhibiting plant pathogen growth as well as by increasing stress resistance.

[1] Sugiura, Nagase *et al.*, *Sci. Rep.* **10**, 18691 (2020); [2] Kim *et al.*, *Nat. Plants* **3**, 17097 (2017)

soybean, acetic acid, germination

発表責任者：橋本　渉（hashimoto.wataru.8c@kyoto-u.ac.jp）

講演番号：4I03-06
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:00～ ミーティングルームⅠ

栄養塩と生活史がオゴノリ科海藻の赤血球凝集活性に及ぼす影響

Effects of nutrients and life history on the hemagglutination activity of the red algal family Gracilariaceae

○垣田 浩孝[1]、小比賀 秀樹[2] ([1]日大院総合基、[2]産総研健康工学)
○Hirotaka KAKITA[1], Hideki OBIKA[2] ([1]Graduate School of Integrated Basic Scences, Nihon Univ., [2]Health Research Institute, AIST)

海藻にも赤血球凝集素が存在することが知られるようになったのは、１９６６年に熱帯海藻２４種類中９種に弱い赤血球凝集活性を検出した報告がされてからである。ある種の海藻では生育水温により生合成される赤血球凝集素含量が変動することが報告された。また同じ種や亜種の間で赤血球凝集素の比活性が異なることも報告されている。そこで本研究では、高比活性の赤血球凝集素を生産する海藻の探索を目的とした。日本産オゴノリ科海藻の培養株について、培地中の栄養塩および海藻の生活史がオゴノリ科海藻由来の赤血球凝集素活性への影響を明らかにすることを目的とした。赤血球凝集素生産株として各オゴノリ科海藻株も評価することを目的とした。オゴノリ科海藻培養株として、オゴノリ科海藻の熊本株、函館株、鹿児島株を用いた。３種類の培養株とも１８℃～２６℃で一番成長速度が速く、赤血球凝集活性も高かった。また四分胞子体と配偶体では、四分胞子体の方が配偶体よりも赤血球凝集活性が高いことが明らかになった。硝酸態窒素とアンモニア態窒素では海藻成長と赤血球凝集活性において違いが見られた。以上の結果から、栄養塩と生活史はオゴノリ科海藻の赤血球凝集活性に影響を及ぼしていることが示唆された。

It became known that hemagglutinin was also present in seaweeds after it was reported in 1966 that weak hemagglutination activity was detected in 9 out of 24 tropical seaweeds. It has been reported that the content of hemagglutinin biosynthesized in some seaweeds varies depending on the temperature of the growing water. It has also been reported that the specific activity of hemagglutinin differs between the same species and subspecies. Therefore, the purpose of this study was to search for seaweeds that produce highly active hemagglutinin. The purpose of this study was to clarify the effects of nutrients in the medium and the life history of seaweeds on the activity of hemagglutinin derived from red algae, Gracilariaceae in Japanese. The purpose was to evaluate each Gracilariaceae strain as a hemagglutinin-producing strain. Kumamoto strain, Hakodate strain, and Kagoshima strain of Gracilariaceae were used. All three types of culture strains had the fastest growth rate and high hemagglutination activity at 18 ° C. to 26 ° C. It was suggested that nutrients and life history influence the hemagglutination activity of Gracilariaceae.

Nutrient, Seaweed, Hemagglutinin

発表責任者：垣田浩孝（kakita.hirotaka@nihon-u.ac.jp）

講演番号：4I03-07
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:00～ ミーティングルーム I

トマト栽培品種と野生品種におけるレクチン分子種の分布と活性の比較
Comparison of the lectin activities among various tomato species.
○小栗 秀、絵面 香央梨、岡本 三奈、佐藤 里杏人、長澤 将太、坂本 光（東農大生物産業）
○Suguru OGURI, Kaori EZURA, Mina OKAMOTO, Rianto SATOH, Shouta NAGASAWA, Hikaru SAKAMOTO (Tokyo Univ. of Agriculture)

【目的】 レクチンは糖と結合するタンパク質である。ナス科植物の生産するキチン結合性レクチンは、トマトでは果実、ジャガイモでは塊茎、チョウセンアサガオでは種子に含まれ、植物体における分布は異なっている。これらのレクチンは、4 個の糖結合ドメイン（CBD）と配糖化ヒドロキシプロリンに富むエクステンシン様ドメインで構成される構造を共通とし、分子量とドメインの配置は異なる。トマト植物体において、熟した果実には 4 個の CBD で構成されるレクチン（TL-F）が含まれる。一方、トマトの小葉と未熟果実においては、3 個の CBD で構成され、アミノ酸レベルで TL-F と 87%の配列の一致を示すイソレクチン TL-L が発現している。レクチンの役割解明の一助としてトマト品種におけるレクチン分子種の分布を調べた。【方法】NBRP トマトより分与されたトマト（*Solanum lycopersicum*）固定栽培種 7 系統と *Solanum* 属トマト野生固定種 4 系統に加えて商業品種 1 種を温室で栽培し、健常な果実と小葉を材料としてそれらの抽出液を調製した。レクチン活性は、ウサギ赤血球の凝集を指標にした。【結果】①供試した 12 品種の果実全てにレクチン活性が検出された。品種間において最大約 20 倍の比活性の差が認められた。抗 TL-F 抗体を用いたイムノブロットでは、野生種 *S. pennellii* に TL-F と異なる分子量を示すレクチンの存在が認められた。②小葉におけるレクチン活性は 2 種の栽培品種 Moneymaker（Mm）と Ailsa craig（Ac)および商業品種サンチェリー（Sc)、2 種の野生品種に検出された。③ゲノムを鋳型とした PCR 法により *TL-L* 遺伝子と *TL-F* 遺伝子を検出した。小葉にレクチン活性を示す Mm と Ac では *TL-L* 遺伝子のみが増幅した。この 2 品種の果実のレクチン活性は微弱であり、ゲノム PCR では *TL-F* 遺伝子が検出されなかった。Mm と Ac はゲノム上に TL-F 遺伝子を欠くことが果実における微弱なレクチン活性の原因と思われた。果実と小葉共にレクチン活性が検出される Sc では、*TL-F* 遺伝子と *TL-L* 遺伝子の双方がゲノム PCR において増幅した。野生品種のゲノム PCR において *TL-L* は検出されなかった。これらの結果から、二種のイソレクチン遺伝子の有無はトマト品種間で異なると考えられた。

Tomato contains different chitin-binding lectins between fruits and leaves. Molecular cloning of their corresponding genes revealed that the fruit lectin is composed of four, while the leaf lectin is composed of three chitin-binding domains. Lectin activities in fruits and leaves were compared among 12 tomato species including 8 cultivars and 4 wild-tomato species.

lectin, *Solanum lycopersicum*, chitin

発表責任者：小栗　秀（s-oguri@nodai.ac.jp）

講演番号：4I03-08
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:00～ ミーティングルーム I

イネのプラントオパールに含まれる有機基質と防御タンパク質
Molecular mechanisms of plant opal formation: Silica nanoparticles and defense proteins

○尾崎 紀昭[1]、鈴木 道生[2]、Nudelman Fabio[3] ([1]秋田県大生資科、[2]東大農、[3]エジンバラ大理工)
○Noriaki OZAKI[1], Michio SUZUKI[2], Fabio Nudelman[3] ([1]Akita Prefect. Univ., [2]Univ. Tokyo, [3]Univ. Edinburgh)

イネは根から能動的に吸収したケイ酸を地上部（葉身・籾殻など）の表層に輸送し、シリカ細胞内腔でケイ酸体（プラントオパール）と呼ばれる非晶質シリカの集合体を形成する。ケイ酸体の機能として外敵からの物理防御、光合成能を向上させるレンズとしての役割、倒伏を防ぐためのガラス骨格としての役割などが考えられている。その形成過程およびナノ構造の解明は農学から材料科学に至る様々な分野への応用につながることが期待される。このような重要性にも関わらず、高等植物におけるシリカ形成の分子機構、特に有機基質に関する知見は、珪藻や海綿動物、細菌と比較すると非常に乏しいのが現状である。我々の研究グループは，イネ葉身に形成されるシリカの中でも、出穂期前後に形成量が増加するファン型ケイ酸体と籾殻シリカに注目して研究を進めてきた。集束イオンビーム・クライオ走査電子顕微鏡（Cryo-FIB-SEM）による内部構造解析により、ファン型ケイ酸体は数十 nm のシリカナノ粒子とその周囲を取り囲む有機基質から構成されることが判明した。また、これまでにファン型ケイ酸体内部および籾殻のシリカに植物防御タンパク質に分類されるタンパク質が存在することを明らかにしている。本発表ではシリカに含まれる防御タンパク質のキャラクタリゼーションおよびその局在性について総括し、イネにおけるシリカ形成の分子機構に関する仮説を紹介したい。

The typical example of silicon accumulating higher plants, gramineous plants (rice plants), produces a large amount of biosilica (amorphous silica) in their leaf blades and rice husks. Although biosilicas deposited in rice plants play various important roles, such as enhancing mechanical strength, improving disease resistance and photosynthetic activity, information on the molecular mechanisms involved in the biosilica formation is very limited. In this study, we investigated the microstructure of biosilicas from rice plants (*Oryza sativa*) by using scanning electron microscopy (SEM) and Cryo-FIB SEM. In addition, we extracted several plant defense proteins from biosilicas of rice plants and characterized by LC-MS/MS analysis. HAADF-STEM analyses revealed that biosilicas are composed of several dozen nm diameter nanoparticles and organic matrices. Most of defense proteins are cationic proteins present in abundance in higher plants and are known to play important roles in resistance to abiotic and biotic environment stress. Given their cationic nature, we hypothesize that they are involved in regulating silica formation in rice plants. Therefore, we are currently investigating whether these proteins are involved in silica formation, not only as the native protective protein.

biomineralization, silica, organic matrix

発表責任者：尾崎紀昭（ozanor@akita-pu.ac.jp）

講演番号：4I03-09
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:00～ ミーティングルーム I

ヤセウツボ種子内においてプランテオースを加水分解するα-ガラクトシダーゼの局在の解明

Subcellular localization of alpha-galactosidase hydrolyzing planteose in *Orobanche minor* germinating seeds

○岡野 ひかる[1]、小川 拓水[1]、杉本 幸裕[2,3]、太田 大策[1]、岡澤 敦司[1,3]（[1]阪府大生命環境、[2]神戸大農、[3]JST/JICA SATREPS）
○Hikaru Okano[1], Takumi Ogawa[1], Yukihiro Sugimoto[2,3], Daisaku Ohta[1], Atsushi Okazawa[1,3]（[1]Osaka Pref. Univ., [2]Kobe Univ., [3]JST/JICA SATREPS）

ハマウツボ科に属する根寄生植物 *Orobanche* spp. および *Striga* spp. は、穀物や野菜の根に寄生するため、アフリカを中心とした農業生産に甚大な被害を与えており、根寄生植物の効果的な防除法を確立することが重要な課題となっている。そこで、我々はヤセウツボ (*Orobanche minor*) 種子の発芽過程の代謝に着目し、代謝に関わる酵素について新たな知見を獲得するための研究を行っている。

代謝プロファイリングの結果、種子において三糖であるプランテオースが貯蔵され、二度の加水分解を経て生成されたグルコースが発芽に利用されていると予想された。次に、発芽種子のトランスクリプトーム解析によって、プランテオースをガラクトースとスクロースに加水分解する α-ガラクトシダーゼ様遺伝子 (*OmAGAL*) を取得したところ、N 末端にシグナルペプチド配列を保持していることが示唆された。その後の酵素アッセイの結果、至適 pH が 5.0 であったことから、OmAGAL は植物組織において酸性条件下にあるアポプラストあるいは液胞で機能していることが予想された。

OmAGAL の細胞内局在を明らかにするために OmAGAL の C 末端に蛍光蛋白質 mCherry を付与し、タバコ (*Nicotiana benthamiana*) の葉で一過性発現させたところ、アポプラストで蛍光が観察された。また、OmAGAL:mCherry を過剰発現させたタバコ BY-2 細胞の培養液から抽出した蛋白質溶液において、α-ガラクトシダーゼ活性が確認された。これらの結果から OmAGAL はアポプラストで機能していることが示唆され、OmAGAL に関する新たな知見を獲得することができた。

Orobanchaceae plants including *Orobanche* spp. and *Striga* spp. have a negative impact on agricultural production since they parasitize roots of crops and vegetables. Therefore, the effective control of root parasitic plants is an important issue. We are focusing on the metabolism of *Orobanche minor* germinating seeds to find a target of control. As a result of metabolic profiling, it was revealed that the seeds contain planteose as storage sugar and glucose is used for germination after two hydrolysis steps. In addition, we acquired α-galactosidase-like gene (*OmAGAL*) by transcriptome analysis and expected that it could work in apoplasts or vacuoles due to biochemical characteristics of OmAGAL. To clarify the localization of OmAGAL, we fused fluorescent protein mCherry at C-terminus of OmAGAL. As a result of transient expression in *Nicotiana benthamiana*, fluorescence was observed in apoplasts. Besides this result, another evidence, suggesting that OmAGAL works in apoplasts, will be also presented in this presentation.

parasitic plants, alpha-galactosidase, apoplast

発表責任者：岡澤敦司（okazawa@plant.osakafu-u.ac.jp）

講演番号：4I03-10
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:00～ ミーティングルーム I

β-コングリシニンとグリシニンの超複合体形成メカニズムの解析

Analysis of formation mechanism of the super-complex between β-conglycinin and glycinin

○奥田 綾[1]、栗栖 文彦[2]、東野 ゆうき[2]、増田 太郎[2]、清水 将裕[1]、守島 健[1]、佐藤 信浩[1]、井上 倫太郎[1]、杉山 正明[1]、裏出 令子[1] ([1]京大複合研、[2]京大院農)
○Aya OKUDA[1], Fumihiko KURISU[2], Yuki HIGASHINO[2], Taro MASUDA[2], Masahiro SHIMIZU[1], Ken Morishima[1], Nobuhiro SATO[1], Rintaro INOUE[1], Masaaki SUGIYAMA[1], Reiko URADE[1] ([1]KURNS, [2]Kyoto Univ.)

ダイズ種子貯蔵タンパク質であるβ-コングリシニン(7Sα、7Sα’、7Sβ)とグリシニン(11S)は小胞体で合成され立体構造が形成された後、ゴルジ体を経由してタンパク質貯蔵液胞に輸送され蓄積する。しかし、7S の合成量が低下すると、11S の大部分がゴルジ体を経由せずに小胞体から出芽したプロテインボディーに蓄積される。先行研究により、11S は 7S と非共有結合により会合して超複合体を形成することで、ゴルジ体を経由して効率的に貯蔵液胞に輸送されていることが示唆された。そこで、7S と 11S の会合メカニズムを解明するために、前駆体型 7S (pro7Sα’、pro7Sα)、成熟型 7S (7Sα’、7Sα、7Sβ)および前駆体型 11S(proA1aB1b)のリコンビナントタンパク質を作製し、ブルーネイティブ電気泳動およびウエスタン・ブロット分析により *in vitro* での超複合体形成を解析した。その結果、proA1aB1b は pro7Sα あるいは pro7Sα’とは会合するが、それ以外の 7S 標品とは会合しないことが明らかとなった。このことから、会合には pro7Sα および pro7Sα’に存在する pro-peptide が必要であることが示唆された。また、超複合体の形成は 2-メルカプトエタノール存在下で阻害されることから、proA1aB1b の 3 個の分子内ジスルフィド結合のいずれかが会合に必須であると推定された。そこで、システイン変異 proA1aB1b(C12S、C88S、C271S)を用いた複合体形成解析を行い、超複合体形成に必要な 11S 分子のジスルフィド結合の絞り込みに成功した。

β-conglycinin (7S) and glycinin (11S), which are soybean seed storage proteins, are synthesized in the endoplasmic reticulum and form a tertiary structure. Then, they are transported to the protein storage vacuole through the Golgi apparatus. However, when the expression level of 7S decreases, most of 11S are accumulated in the protein body derived from the ER without transiting through the Golgi apparatus. Previous studies suggested that 7S and 11S form a super-complex with non-covalent binding, enabling efficient transportation of 11S. In this study, in order to elucidate the association mechanism of 7S and 11S, we prepared the recombinant proteins, each subunit of 7S and 11S (proA1aB1b), and performed *in vitro* analysis of the super-complex formation using them. ProA1aB1b associated only with pro7Sα or pro7Sα', suggesting that the pro-peptides of pro7Sα and pro7Sα' are necessary for the association with 11S. Since the formation of the super-complex was inhibited in the presence of 2-mercaptoethanol, it was supposed that any of the three intramolecular disulfide bonds in A1aB1b could be essential for the association. Furthermore, *in vitro* analysis using cysteine mutants of proA1aB1b narrowed down the candidates for disulfide bonds needed for the formation of the super-complex.

Soybean, Glycinin, β-conglycinin

講演番号：4I03-11
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:00～ ミーティングルーム I

ナノディスク上に再構成した天然ゴム生合成酵素の活性解析

Functional analysis for reconstituted rubber synthetic enzyme on nanodiscs

○黒岩 風[1]、西野 輝[1]、廣森 美樹[2]、モンドル 慶子[1]、山口 晴彦[3]、宮城 ゆき乃[3]、山下 哲[4]、高橋 征司[2]、戸澤 譲[1] ([1]埼玉大院理工、[2]東北大院工、[3]住友ゴム工業（株）、[4]金沢大理工)
○ Fu KUROIWA[1], Akira NISHINO[1], Miki HIROMORI[2], Yasuko MANDAL[1], Haruhiko YAMAGUCHI[3], Yukino MIYAGI[3], Satoshi YAMASHITA[4], Seiji TAKAHASHI[2], Yuzuru TOZAWA[1] ([1]Saitama Univ., [2]Tohoku Univ., [3]Sumitomo Rubber Industries, [4]Kanazawa Univ.)

パラゴムノキ（*Hevea brasiliensis*）由来の天然ゴムは，Isopentenyl pyrophosphate (IPP) の重合によって生合成され，リン脂質一重膜で囲まれた構造であるゴム粒子内部に貯留されるが，酵素触媒の詳細機構には未知の部分が多い．我々は，コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系（セルフリーサイエンス社）にナノディスク（ND）を添加することで，翻訳と共役したタンパク質の脂質膜への再構成を進め，天然ゴム合成に関わると推定してきたタンパク質の機能解析を行った．ポリイソプレン鎖合成酵素活性は，前駆体Farnesyl pyrophosphateと重合基質^{14}C標識IPPを反応させることにより解析した．その結果，ポリイソプレン鎖合成活性はHRT1とHRBPを共合成したND・タンパク質複合体にのみ確認され，NDにHRT1またはHRBPを単独で再構成した複合体には見られなかった．さらに同様の解析手法をグアユール（*Parthenium argentatum* A. Gray）のHRT1およびHRBPホモログであるPaCPTおよびPaCBPにも適用したところ，同様に両者の共存がポリイソプレン鎖合成活性に必須であるという結果を得た．
これらの結果は，HRT1とHRBPの相互作用がポリイソプレン鎖合成の触媒活性に必須であることの普遍性を初めて明らかにしたものであり，天然ゴム合成酵素系を構成するコア酵素タンパク質の触媒機能を分子レベルで明らかにする上で重要な足掛かりが得られたと考えている．

Natural rubber is synthesized by polymerization of isopentenyl pyrophosphate (IPP) and accumulated in rubber particles of the Para rubber tree (*Hevea brasiliensis*). However, precise molecular mechanisms of the enzyme reaction remained to be elucidated. In this study, we performed reconstitution of rubber-synthesis-related proteins on the nanodiscs (NDs) and examined the polyisoprene synthesis activity of the protein-ND complexes. With farnesyl pyrophosphate as a primary substrate, we traced the radioactivity of polymerized ^{14}C-labelled IPP.
HRT1/HRBP/ND complexes, obtained from the co-translation of both HRT1 and HRBP in the presence of NDs, exhibited the polyisoprene synthesis activity. On the other hand, HRT1/ND or HRBP/ND complex did not show IPP polymerization activity. We further tested PaCPT and PaCBP which are HRT1- and HRBP-homologues from guayule (*Parthenium argentatum* A. Gray) and obtained similar results. These results indicate that polyisoprene synthesis activity requires both HRT1 and HRBP. Our findings will open new avenues to clarify the enzyme functions of polyisoprene synthesis at the molecule level.

natural rubber, *Hevea brasiliensis*, *in vitro* translation

発表責任者：戸澤譲（tozawa@mail.saitama-u.ac.jp）

講演番号：4I03-12
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:00～ ミーティングルーム I

接合伝達を利用した単細胞真核紅藻 *G. sulphuraria* への外来遺伝子導入系の確立

Establishment of gene introduction system into *G. sulphuraria* using conjugation

○中村 裕太[1]、板谷 光泰[2]、渡辺 智[1] ([1]東農大農、[2]信州大工)
○Yuta NAKAMURA[1], Mitsuhiro ITAYA[2], Satoru WATANABE[1] ([1]Tokyo Univ. of Agric., [2]Shinsyu Univ.)

遺伝子の水平伝播は自然界での微生物の多様性に貢献することが知られている。水平伝播の一つの要因とされている接合伝達は伝達性プラスミドを持つ菌（Doner）から対象の生物（Recipient）への DNA の移動を可能とする。接合伝達の一つ T4SS システムは広宿主域の遺伝子の移動が可能であり、これまでに異種原核生物間だけでなく、真核生物である酵母を Recipient とした遺伝子の移動も報告されている（Heinemann *et al.*, Nature., 1989, Itaya *et al.*, J. Biochem., 2018)。

単細胞真核紅藻 *Galdieria sulphuraria* (以下ガルデリア）は高温、強酸性、重金属イオンを含む極限環境で生育可能であり、環境ストレス耐性機構の研究対象として有用であるだけでなく、物質生産のホストとしても期待できる。しかし、ガルデリアの形質転換法は未だ確立されておらず、ガルデリア研究の推進には分子遺伝学的な解析ツールの整備が不可欠である。

本研究では接合伝達によるガルデリアへの外来遺伝子導入系の確立を目的とした。ガルデリアの光依存性 *APCC* プロモーターとその ORF に *GFP* を融合させ、広宿主域接合伝達プラスミド pUB307 へクローニングした。このプラスミドを持つ大腸菌とガルデリアを接合させ、遺伝子の移動を解析した。PCR による判定ではガルデリアへの外来遺伝子の導入を支持する結果が得られた。さらに GFP を発現する細胞が確認できたことから、接合伝達によりガルデリアに遺伝子を導入可能であることが示された。本成果は、ガルデリアに対する有効な新規の遺伝子導入法として現在、特許出願申請中である（特願 2020-076701）。

Conjugation by the type IV secretion system (T4SS), one of the horizontal gene transfer (HGT), enables the transfer of DNA from bacteria carrying a transmissible plasmid (donor) to a target organism (recipient). Using T4SS, broad-host range gene transfer from *Escherichia coli* to various organisms, such as *Bacillus* species, cyanobacteria, and eukaryotic yeast, has been reported (Heinemann et al., nature., 1989, Itaya *et al.*, J. Biochem., 2018).

The unicellular eukaryotic red alga *Galdieria sulphuraria* can grow under high temperature, acidic and heavy metal ion environments. Therefore, it is expected to have great potential not only a research material for studying environmental stress tolerance, but also a host for producing biomaterials. However, the transformation method of *G. sulphuraria* has not yet been established.

The purpose of this study was establishment of gene introduction system into *G. sulphuraria* using conjugation. *GFP* gene was fused to light-dependent *APCC* promoter and its ORF, which localizes on the chloroplast, and cloned into a T4SS plasmid pUB307. After the conjugation treatment between *E. coli* carrying pUB307 and *G. sulphuraria*, GFP fluorescence has been observed from the chloroplast in recipient cells, indicating that the gene transfer from *E. coli* to *G. sulphuraria*.

Conjugation, *Galdieria sulphuraria*, Gene introduction

発表責任者：渡辺智（s3watana@nodai.ac.jp）

講演番号：4I03-13
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:00～ ミーティングルームⅠ

無細胞翻訳系を用いた *Chlamydomonas reinhardtii* 由来脂肪滴へのタンパク質導入系の確立とそれを用いた脂肪滴移行配列の探索

Establishment of a system for *in vitro* translation-coupled external protein introduction into lipid droplets from *Chlamydomonas reinhardtii* towards elucidation of lipid droplet transit sequence motifs.

○開 琢海[1]、廣森 美樹[1]、和氣 駿之[1]、山下 哲[2]、戸澤 譲[3]、山口 晴彦[4]、宮城 ゆき乃[4]、岩井 雅子[5]、太田 啓之[5]、中山 亨[1]、高橋 征司[1]([1]東北大・院・工、[2]金沢大・院・自然科学、[3]埼玉大・院・理工、[4]住友ゴム工業（株）、[5]東工大・生命理工院)

○ Takumi HIRAKI[1], Miki HIROMORI[1], Toshiyuki WAKI[1], Satoshi YAMASHITA[2], Yuzuru TOZAWA[3], Haruhiko YAMAGUCHI[4], Yukino MIYAGI[4], Masako IWAI[5], Hiroyuki OHTA[5], Toru NAKAYAMA[1], Seiji TAKAHASHI[1] ([1]Grad. Sch. Eng. Tohoku Univ., [2]Grad. Sch. Sci. Tech. Kanazawa Univ., [3]Grad. Sch. Sci. Eng. Saitama Univ., [4]Sumitomo Rubber Ind., Ltd., [5]Grad. Sch. Biosci. Biotech. Tokyo Tech.)

植物の中には疎水性有用特化代謝産物を合成するものが多く存在している。しかし、それらの代謝産物は存在量が微量である場合が多く、代謝工学による高生産が望まれている。大腸菌を宿主とした場合、疎水性化合物を収容可能なシンクオルガネラが細胞内に無いため、外来生合成経路の導入により高生産された化合物が細胞機能に悪影響を及ぼしてしまう。一方で植物などの真核細胞には脂肪滴 (lipid droplet, LD) が存在する。LD とは、脂質一重層で構成されたオルガネラで、内部に主にトリアシルグリセロールを蓄積する。LD の膜上に外来酵素群を導入し、目的とする疎水性化合物を LD 内に隔離的に高蓄積させることが出来れば、それらの安定な高生産が達成可能になると考えた。しかし、LD へのタンパク質移行機構の詳細は未解明な点が多い。そこで本研究では、無細胞翻訳系を利用し，外来タンパク質を翻訳・フォールディングと共役させながら LD 膜へ導入する手法を開発し，それを用いて LD 移行配列とその移行機構を明らかにすることを目的とした。まず，クラミドモナス（*Chlamydomonas reinhardtii*）より調製した LD を無細胞翻訳系に添加し、LD の形成後にサイトゾルから移行すると推定される LD 膜タンパク質を緑色蛍光タンパク質（GFP）融合型として発現させた。各種条件の最適化によりそのタンパク質を LD へ導入する手法を確立できたことから、その系を用いて移行に必要とされるドメインやモチーフを絞り込むことで、LD 移行配列を探索した。

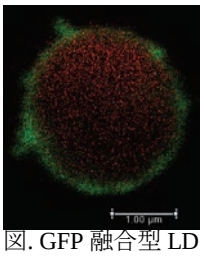


図. GFP 融合型 LD 膜タンパク質の LD への導入 (緑: GFP, 赤: Nile Red)

Many of the hydrophobic plant specialized metabolites are industrially valuable and their mass productions are desired. However, high accumulation of hydrophobic xenobiotic compounds in cells by metabolic engineering methods may affect adversely on cell functions. Eukaryotes have a sink organelle, lipid droplet (LD), which harbors hydrophobic compounds, such as triacylglycerol, in the lipid monolayer membrane. Therefore, we considered that high production of the hydrophobic valuable compounds could be achieved by introducing target compounds into LD by assembling metabolic enzymes onto the LD membrane. However, the mechanism for protein transition to the LD membrane is still unknown. Therefore, in this study, we tried to elucidate the sequence motifs function in the protein transition to LD with a cell-free translation system. Firstly, with a cell-free translation system, we successfully introduced LD membrane proteins, presumed to be recruited from the cytosol to the LD membrane in the cells, into LDs from *Chlamydomonas reinhardtii*. By using this system, essential sequence motifs for transition were characterized.

Lipid droplet, Cell-free translation system, *Chlamydomonas reinhardtii*
発表責任者：高橋征司（seiji.takahashi.a7@tohoku.ac.jp）

講演番号：4I03-14
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:00～ ミーティングルーム I

NBRP トマト変異体コレクションの代謝物データとその利用

Metabolite analysis of mutants in NBRP-Tomato mutant collections

○杉本 貢一[1]、星川 健[1,2]、篠崎 良仁[1,3]、伊藤 直子[1]、藤森 陽子[1]、江面 浩[1] ([1]筑波大 T-PIRC、[2]国際農研 生物資源・利用、[3]東京農工大 グローバルイノベーション研究院)
○Koichi Sugimoto[1], Ken Hoshikawa[1,2], Yoshihito Shinozaki[1,3], Naoko Ito[1], Yoko Fujimori[1], Hiroshi Ezura[1] ([1]Univ. Tsukuba, [2]JIRCAS, [3]Tokyo Univ. Agric. Technol.)

トマト果実に含まれる様々な代謝物はトマトの質を決定する重要な要因である。例えば高糖度トマトやうまみ成分の多いトマトは現在でも育種ターゲットとなる形質である。ナショナルバイオリソースプロジェクト（NBRP）- トマトでは研究用モデルトマトとしてマイクロトムを親品種とした変異体の収集を行っており、今発表では収集した変異体の果実成分分析結果について報告する。糖度・カロテノイド含量・アミノ酸含量について、今年度新たに約 50 系統・3 反復のデータを収集し、これまでの収集データと合わせて約 150 系統分のデータを蓄積した。果実重量と糖度の分布は、この 2 形質が負の相関関係にある事を示した。一方でカロテノイドやアミノ酸は糖度と正の相関関係があった。また、グルタミン酸含量に関して、相関から外れた変異体を発見する事ができた。この結果は、NBRP トマトの植物体リソースを用いることでうまみ成分であるグルタミン酸量を制御する因子を発見できる可能性を示唆している。これらのデータの一部は変異体データベースサイト TOMATOMA（https://tomatoma.nbrp.jp/）から公表している。

Metabolite content/composition is one of the critical factors of fruit quality in tomato and is, even now, a breeding target to improve its taste and nutrition. In the National BioResource Project (NBRP)-Tomato, we developed the mutant collection of the experimental model cultivar, Micro-Tom and measured their brix value and carotenoid and amino acid contents. Here we report the data obtained from new 50 mutants in addition to the previously reported data from 100 mutant lines. Collectively, the brix value showed negative correlation to the fruit weight but showed positive correlation to the carotenoid and amino acid contents. Additionally, we found an outlier mutant in glutamic acid content. This result implies the mutation in the regulatory gene of glutamic acid accumulation. We also introduce our TOMATOMA database (https://tomatoma.nbrp.jp/) that contains mutant information including a part of metabolite data.

Tomato mutants, Nutritional metabolites, Bioresource

発表責任者：杉本貢一（sugimoto.koichi.gu@u.tsukuba.ac.jp）

講演番号：4I03-15
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:00～ ミーティングルーム I

アブシジン酸存在下で増殖と細胞死を共に抑制したタバコ BY-2 細胞からのタンパク質の分泌
Protein secretion from proliferation- and cell death- arrested tobacco BY-2 cells cultured in abscisic acid-containing medium

○井上 智晴[1]、小田 大和人[1]、丸山 明子[1,2]、松岡 健[1,2] ([1]九大・院生資環、[2]九大・院農)
○Tomoharu INOUE[1], Yamato ODA[1], Akiko MARUYAMA[1,2], Ken MATSUOKA[1,2] ([1]Kyushu Univ., Grad. Sch. Bio-Environ. Sci, [2]Kyushu Univ., Fac. Agr.)

植物の多くの組織はある一定の段階まで成長・分化すると、細胞分裂を停止し、そのままの状態で数ヶ月以上の長期間にわたり活動を続ける。この分裂せずに長い期間活動を続けるという組織中の植物細胞の状態をタバコ培養細胞 BY-2 株でも再現することができれば、物質生産の際のコスト低下を図れる可能性がある。この細胞は 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸(2,4-D)非存在下、アブシジン酸(ABA)またはジャスモン酸存在下で培養すると細胞周期が停止することが報告されている(Swiatek, A. et al., Plant Physiol. 128:201-211, 2002)。この情報を参考にして ABA 存在下における細胞の増殖、生存期間、この条件でモデルタンパク質の分泌能が保たれているのか、また培地成分の量の変化について検討を進めた。その結果、2,4-D を含む通常培地では 2 週間程度で死滅する BY-2 細胞が、ABA 培地中では細胞の増殖が抑えられた状態で 1 ヶ月以上死亡率を上昇させずに培養可能なことを見出した。この条件下におけるタンパク質の分泌量の変化について、複数のモデルタンパク質を分泌する形質転換 BY-2 細胞を用いて検討したところ、異なるタンパク質によって異なる変化を示すという結果が得られた。また ABA 存在下における培地成分の変化についてショ糖、リン酸イオン、硝酸イオンを対象にこれらの濃度変化を検討したところ、予備的な結果であるが、2,4-D 条件のものと違いは認められなかった。

When plant tissues grow and differentiate to a certain stage, they stop cell division but continue operating their function for several months. If such state can be reproduced in cultured tobacco BY-2 cell, it will be possible to reduce the cost of the production of valuable substances using this cell line. It has been reported that cell cycle is arrested when these cells are cultured in the presence of ABA. We investigated whether BY-2 cells could survive under such conditions and found that the cells did not increase mortality without cell proliferation more than 1 month. Transformed BY-2 cells secreting model proteins were used to examine whether protein secretion ability is maintained under the ABA condition. We found that different protein exhibit different secretory kinetics under the condition. In contrast, when the changes in the concentrations major nutrients in the medium was examined, no significant difference was observed between the 2,4-D and ABA conditions.

Cell death, ABA, Secretion

講演番号：4J02-01
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:30～ ミーティングルーム J

高グルコースが細胞の機能に与える影響

Effect of high glucose on cell functions.

○萩原 真[1]、松下 健二[2] ([1]新潟県大健康栄養、[2]国立長寿口腔疾患)
○Makoto HAGIWARA[1], Kenji MATSUSHITA[2] ([1]Dep. of Health and Nutr., Univ. of Niigata Prefect., [2]Dep. of Oral Dis. Res., NCGG)

エンドサイトーシスは、受容体を介したシグナル伝達、栄養成分の取り込みなどに関わり真核細胞において重要な役割を担っている。このエンドサイトーシスの初期は、Rab ファミリータンパク質の一つである低分子量 G タンパク質 Rab5 によって調節されている。

一方、糖は細胞内でエネルギーの源となる重要な物質である。しかし、過剰な糖の摂取は生活習慣病のリスクを高める。また、近年、高グルコースはエンドサイトーシスの機能を低下させるとの報告がある。そこで、本研究では、培養細胞を用いて、高グルコースが細胞に与える影響について解析したので報告する。

まず、高グルコースは、細胞の増殖を上昇させることを明らかにした。次に、高グルコースは MAPK のリン酸化を上昇させることや炎症関連因子 IL-6 や iNOS の発現を上昇させた。さらに、高グルコースは、Rab5 の活性に影響しエンドサイトーシスの機能を阻害する可能性が示唆された。

本発表では、高グルコースとエンドサイトーシスや生活習慣病との関連性についても議論したい。

Endocytosis is important for signal transduction and nutrient uptake in eukaryotic cells. Early stage of endocytosis is regulated by small GTPase Rab5, one member of the Rab family.

On the other hand, glucose is a primary energy source for all of the cells in our bodies. However, high glucose increases the risk for lifestyle related disease. Recent studies showed that high glucose inhibits endocytosis. In the present study, we analyzed effect of high glucose on cell function by using cultured cells.

Our results showed that 1) high glucose increased cell proliferation, 2) phosphorylation of MAPK, IL-6 and iNOS expression, and 3) inhibited endocytosis by reducing Rab5 activity.

Based on these data, we will also discuss relationship between high glucose, endocytosis and lifestyle related disease.

Glucose, Endocytosis, Rab5

発表責任者：萩原真（hagimako@unii.ac.jp）

講演番号：4J02-02
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:30～ ミーティングルーム J

サル膵管オルガノイド作製と Tuft 細胞への分化誘導系の確立
Generation of primate pancreatic ductal organoids and their differentiation into tuft cells
○坂口 恒介[1]、中嶋 ちえみ[2]、稲葉 明彦[3]、石井 栞[1]、熊谷 孝太郎[1]、佐藤 晃司[1]、今井 啓雄[3]、山根 拓実[1]、大石 祐一[1]、岩槻 健[1] ([1]東京農大応用、[2]遺伝研神経、[3]京大ゲノム)
○Kousuke Sakaguchi[1], Chiemi Nakajima[2], Akihiko Inaba[3], Shiori Ishii[1], Kotaro Kumagai[1], Koji Sato[1], Hiroo Imai[3], Takumi Yamane[1], Yuichi Oishi[1], Ken Iwatsuki[1] ([1]Tokyo Univ. of Agriculture, [2]National Institute of Genetics, [3]Kyoto Univ.)

膵管は腺房細胞が分泌する消化酵素を集め膵液として十二指腸に運ぶ重要な外分泌機能を担うが、直接十二指腸に接続されていることから、常に消化管内の外来物質に晒される危険性を有している。我々は膵管に低頻度で出現する tuft 細胞の特徴が、消化管や気道に存在する生体防御反応を担う tuft 細胞に類似していることから、膵管においても同様の機能を担うという仮説を立てた。同仮説を *in vitro* にて証明するため、膵管オルガノイド培養系を構築し、tuft 細胞への分化誘導系の確立を目指した。まず、ヒトと同じ霊長類であるサル膵管オルガノイドを、酵素処理で単離した膵管をマトリゲルに包埋し、ニッチ因子等を含む培地にて培養することで作製した。同培養系は種々の幹細胞ニッチ因子から構成され、未分化細胞の増殖を促進するため、分化細胞はほとんど観察されない。そこで数あるニッチ因子の中から Nicotinamide と EGF を除くことで、tuft 細胞の効率的な分化誘導方法を確立した。

本研究により確立した膵管の *in vitro* 培養系を活用すれば、これまで困難だった tuft 細胞の機能解析が容易となる。今後、消化管内に存在する食品因子や菌体成分の中で tuft 細胞を活性化させるリガンドを同定し、tuft 細胞を介した膵臓の新たな生体防御機構の解明につなげたい。

Pancreatic ducts exert an essential exocrine function of secreting digestive enzymes produced by acinar cells. However, owing to its connection to duodenum papillae, pancreatic duct cells always have risks of being exposed to hazardous substances. There is a minor cell, named tuft cells, in the pancreatic ducts that resemble tuft cells in the gastrointestinal tract and respiratory tract and possess biophylactic activity. We hypothesized that tuft cells in the pancreas also have self-defense activity and therefore aimed to generate pancreatic ductal organoids that have a potential to differentiate into tuft cells. We have generated pancreatic ductal organoids from the macaque by embedding pancreatic ducts in Matrigel followed by supplementation of the niche factors. Then we established the method for efficient induction of differentiation into tuft cells by reducing Nicotinamide and EGF from the niche factors.

Using this culture system we hope to identify chemicals of food components or bacterial contaminants that activate tuft cells which will help us elucidate a new biophylactic function of the pancreas.

pancreatic duct, organoid, tuft cell

発表責任者：岩槻健（ki204886@nodai.ac.jp）

講演番号：4J02-03
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:30～ ミーティングルーム J

Afamin-Wnt3a CM は霊長類消化管オルガノイドの細胞分化をサポートする

Afamin-Wnt3a CM supports cell differentiation in primate intestinal organoids

○有永 理峰[1]、岡村 真子[1]、山本 咲也香[1]、トゥープティアンラット ナパッソーン[1]、稲葉 明彦[2]、今井 啓雄[2]、山根 拓実[1]、大石 祐一[1]、岩槻 健[1]([1]東京農大　応用、[2]京大)
○Ayane ARINAGA[1], Mako Okamura[1], Sayaka Yamamoto[1], NAPATSORN THUPTIANRAT[1], Akihiko Inaba[2], Hiroo Imai[2], Takumi Yamane[1], KenYuichi Oishi[1], Ken Iwatuki[1] ([1]Tokyo Univ. of Agriculture, [2]Kyoto Univ.)

消化管には栄養素を吸収する吸収上皮細胞をはじめ、ホルモン分泌や生体防御などの様々な機能を有する細胞が存在する。我々は、味覚受容関連分子を発現することから味細胞様細胞と呼ばれる内分泌細胞と Tuft 細胞の機能解明を目指している。両細胞は、消化管上皮内における存在比率は 1%以下と少なく、細胞の活性化や細胞内シグナル伝達機構などについては不明な点が多い。そこで、近年開発されたオルガノイド培養法を導入し、味細胞応答がげっ歯類よりもヒトに近いサルの消化管を用いて、これら味細胞様細胞の解析を進めているが、分化誘導に課題を残している。本研究では、オルガノイド培養系において重要な因子である Wnt3a 活性と細胞分化について調べた。
まず、Wnt3a を安定化するタンパク質である Afamin と Wnt3a を同時に発現させた培養上清である Afamin-Wnt3a CM を用いて、消化管オルガノイドの分化検討を行った。その結果、Afamin-Wnt3a CM では従来の L1 細胞によって産生される L-Wnt3a CM に比べて多くの Tuft 細胞分化が観察された。さらに同条件では、GIP、GLP、Motilin などのホルモンを産生する内分泌細胞も観察され、細胞分化を促進させるために Afamin-Wnt3a CM の利用が有効であると結論づけた。
本研究により、消化管に存在する Tuft 細胞および内分泌細胞の分化効率を上げる新たな培養条件が確認された。同方法により、存在割合の低い Tuft 細胞および内分泌細胞の機能解析が容易になり、腸管上細胞が生体恒常性に与える役割の理解に貢献すると期待される。

We have investigated the function of endocrine cells and tuft cells, which resemble taste cells in the oral cavity. These taste-like cells exist in less than 1% of the small intestine, therefore making us difficult to examine their functions. We have recently introduced an organoid culture system to analyze these taste-like cells. Organoids were generated from non-human primate that exert taste response more similar to human than with rodents. However, there exist difficulties in cell differentiation. To overcome this problem, we examine whether there is a correlation between Wnt3a activity and cell differentiation. Therefore, we investigated the differentiation of gastrointestinal organoids using Afamin-Wnt3a CM, a culture supernatant simultaneously expressing Wnt3a and Afamin, a protein that stabilizes Wnt3a. The results showed that more tuft cell differentiation was observed in Afamin-Wnt3a CM than in L-Wnt3a CM. Furthermore, endocrine cells producing hormones such as GIP, GLP and Motilin were also observed under the same conditions. We concluded that the use of Afamin-Wnt3a CM was effective in promoting cell differentiation. This study showed a new culture condition to increase the differentiation efficiency of tuft cells and endocrine cells in the small intestine. The method may facilitate functional analyses of low percentage of tuft cells and endocrine cells, and contribute to understand the role of intestinal epithelial cells in biological homeostasis.

Intestinal Organoid, Tuft cells, Wnt3a

発表責任者：岩槻　健（ki204886@nodai.ac.jp）

講演番号：4J02-04
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:30～ ミーティングルーム J

コラーゲン架橋分子ピリジノリンは破骨細胞分化を抑制する

Pyridinoline, a collagen crosslink, inhibits osteoclast differentiation

○岡田 楓夏、三宅 春奈、関口 陽香、村上 庸人、早瀬 文孝、渡辺 寛人 (明治大農)
○Fuka OKADA, Haruna MIYAKE, Haruka SEKIGUCHI, Yoto MURAKAMI, Fumitaka HAYASE, Hirohito WATANABE (Meiji Univ.)

近年われわれは、3-ヒドロキシピリジニウム（3-HP）構造を有する最終糖化産物（Advanced glycation end-products）が、細胞膜受容体（RAGE）を介して細胞毒性を発揮することを明らかにした[1)]。これをもとに、3-HP 構造をもつ未知の RAGE リガンドを探索した結果、コラーゲン架橋分子ピリジノリンを同定した[2)]。ピリジノリンはコラーゲン線維の物性に寄与するほか、骨吸収時に遊離する性質をもつことから、骨吸収マーカーとして臨床利用されているが、上述の研究成果はピリジノリンが受容体を介して細胞に作用しうることを示唆するものであると考えられる。骨組織は破骨細胞による骨吸収と、骨芽細胞による骨形成によってその質・形態が維持されるが、これら細胞には RAGE の発現が確認されている。このことから、骨吸収により遊離したピリジノリンが RAGE を介してこれら細胞の分化や機能を制御しうると考えられる。そこで本研究では、とくに破骨細胞に対するピリジノリンの作用を解析した。マウスマクロファージ細胞株 RAW264.7 に RANKL を作用させ破骨細胞分化を誘導し、ピリジノリン共存による分化状態の変化を解析した結果、ピリジノリンの作用によって巨大な破骨細胞が有意に減少することが明らかとなった。さらに破骨細胞マーカー遺伝子の発現がピリジノリンにより抑制される傾向が示された。これらのことから、ピリジノリンが破骨細胞分化を抑制することで骨代謝調節作用を発揮しうることが示唆された。

1) Murakami Y et al. Biosci Biotechnol Biochem. 82, 312-319 (2018).
2) Murakami Y et al. Biosci Biotechnol Biochem. 82, 1508-1514 (2018).

Recently, we identified pyridinoline (Pyr), a collagen crosslink, as a novel intrinsic ligand for the receptor for RAGE (receptor for AGEs). While it is well established that Pyr released by osteoclasts (OCs) is used as a biomarker of bone resorption, physiological roles of Pyr on bone homeostasis are unclear. In the present study we analyzed the effects of Pyr on OCs. TRAP and F-actin staining revealed that Pyr significantly inhibited RANKL-induced differentiation of RAW264.7 cells into large maultinucleated OCs. These data indicate that Pyr regulates bone metabolism by suppressing osteoclastogenesis.

Pyridinoline, Osteoclasts, Bone metabolism

講演番号：4J02-05
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:30～ ミーティングルーム J

がん細胞の増殖と遊走に対するコラーゲンペプチドの効果

The effect of collagen peptide on proliferation and migration of cancer cells

○倉田 淳代[1]、木村 泰久[1]、松尾 道憲[2]、木岡 紀幸[1] ([1]京都大農、[2]京都女子大家政)
○Atsuyo KURATA[1], Yasuhisa KIMURA[1], Michinori MATSUO[2], Noriyuki KIOKA[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Kyoto Women Univ.)

コラーゲンは、ヒトの全タンパク質の約 30%を占め、細胞外マトリックスの主要タンパク質である。コラーゲンを食物として摂取した場合、コラーゲンは Pro-Hyp(ヒドロキシプロリン)の特殊なアミノ酸配列リピートを多く含むために Pro-Hyp ジペプチドとして吸収され、それが血漿中に現れることがわかっている。この Pro-Hyp ジペプチドは細胞の増殖や分化など細胞の機能に影響を与えることが知られている。また、創傷治癒時に、体内組織を構成するコラーゲンが分解されることで Pro-Hyp ジペプチドが産生され、生理機能を発揮する可能性が示唆されている。一方で、これまでにがん細胞が浸潤の際コラーゲンを分解するとの報告はあるが、Pro-Hyp が、がん細胞に対してどのような効果をもたらすのかは明らかになっていない。

本研究では生体内での状況に着目し、Pro-Hyp ジペプチドが、がん細胞の増殖と遊走に与える効果を調べた。細胞は、すい臓がん由来の細胞株 AsPC-1 を用いた。増殖アッセイについては、培養基板としてプラスチックシャーレ、またはコラーゲンゲルを用いた。AsPC-1 細胞を培養基板に播種後、培地に Pro-Hyp ジペプチドを 200 μM と 1 mM あるいは Pro と Hyp 混合物を 200 μM と 1 mM を添加し、Cell Counting kit-8 を用いて増殖を評価した。遊走について、AsPC-1 細胞を播種し、培地に Pro-Hyp ジペプチドを 1 mM あるいは Pro と Hyp 混合物を 1 mM を添加し、Xcelligence を用いてリアルタイムでの細胞のランダム遊走を評価した。その結果、FBS 2%培養下で、Pro-Hyp ジペプチド添加による AsPC-1 細胞の増殖促進の傾向がみられた。この効果はゲル上でより顕著であった。また、Pro-Hyp ジペプチド添加で AsPC-1 細胞の遊走促進が示唆された。これらの結果より、生体内で分解された後もコラーゲンが細胞調節の役割を持つことが期待される。現在、Pro-Hyp ジペプチドが作用するこれらのメカニズムについて検討中である。

Pro-Hyp dipeptide is known to affect cell functions such as cell proliferation and differentiation. Although it has been reported that cancer cells degrade collagen during invasion, it is not clear whether Pro-Hyp has effects on cancer cells. In this study, we investigated the effects of Pro-Hyp dipeptide on proliferation and migration of cancer cells. We found that Pro-Hyp dipeptide has a tendency to promote the proliferation of AsPC-1 pancreatic cancer cells under 2% FBS condition. This effect was more pronounced on the collagen gel. The addition of Pro-Hyp dipeptide also promoted migration of AsPC-1 cells. These mechanisms are currently under investigation.

collagen peptide, cancer cell, migration

講演番号：4J02-06
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:30～ ミーティングルーム J

メチオニンは TSC2 メチル化を介して mTORC1 活性を制御する
Methionine regulates mTORC1 activity via TSC2 methylation

○玄 成秀、松本 雄宇、鈴木 司、井上 順、山本 祐司 (東京農業大学)
○Seishu GEN, Matsumoto Yu, Tsukasa Suzuki, Jun Inoue, Yuji Yamamoto (Tokyo University of Agriculture)

【背景・目的】 ガン抑制タンパク質 TSC2 は、国指定難病である結節性硬化症の原因タンパク質である。インスリンシグナルの中間因子である TSC2 は、細胞増殖を司る mTORC1 を負に制御する。一方で、インスリンにより活性化した AKT に TSC2 はリン酸化を受け、mTORC1 を介した細胞増殖を促進する。これまで、TSC2 の新規翻訳後修飾に着目した当グループは、メチル化酵素 PRMT1 による TSC2 の R1457/R1459 のメチル化が Akt 依存的な T1462 のリン酸化の妨害し、TSC2 を安定化することを明らかにした［*Gen et al; Sci. Rep. (2020)*］。メチル基供与体 SAM は、メチオニン（Met）の代謝産物であり、ガンとの関係性が深い。そこで、メチル化修飾を介した TSC2 の機能制御メカニズムの可能性がについて検討した。本研究は、Met が TSC2 メチル化を介して mTORC1 活性を制御するかを解析した。
【方法・結果】 まず初めに、Met が TSC2 の安定化に寄与するかを、Met 欠乏培地および SAM 合成酵素 MAT2a 阻害剤シクロロイシンを用いて TSC2 タンパク質発現量を解析した。結果、それぞれの添加に伴い TSC2 タンパク質発現量の低下が見られた。次に、Met とインスリンが TSC2 において影響するか、Met 欠乏培地およびインスリンシグナル阻害剤 LY294002 を用いて解析した。結果、Met 欠乏に伴う TSC2 タンパク質発現量の低下が LY294002 添加で回復した。最後に、TSC2 メチル化が mTORC1 活性に及ぼす影響を解析した。さらに、HeLa 細胞にメチル化阻害剤 AMI-5 を添加し、mTORC1 の活性指標 S6K のリン酸化を解析した。結果、TSC2 メチル化時に、TSC2 不安定化に伴う S6K 活性が上昇した。
【総括】 Met が TSC2 メチル化を介して mTORC1 活性を制御することを明らかにした。本研究は、ガン抑制タンパク質 TSC2 の新規制御メカニズムの一端を示した。

Tuberous sclerosis complex 2 (TSC2), a tumor-suppressor protein, activity is mainly regulated by insulin stimulation, which promotes cell growth via mTORC1 activation. Previously, we show that TSC2 is methylated at R1457/59 by protein arginine methyltransferase 1 (PRMT1) and affects the phosphorylation status of TSC2 at Thr1462 and is essential for TSC2 stability and mTORC1 activity [*Gen et al; Sci. Rep. (2020)*]. The methyl-donor SAM is a metabolite of methionine. In this study, we show that methionine affects TSC2 stability via its methylation. Furthermore, we found that activation of insulin signaling contributed to TSC2 degradation in a methionine deprivation-dependent manner. Thus, methionine controls mTORC1 activity via TSC2 methylation.

＊日本農芸化学会の第 72 回国際会議出席費補助金に採択され、EMBO/ASCB Meeting 2019 に出席しました。

TSC2 methylation, methionine, mTORC1

発表責任者：玄成秀（44518001@nodai.ac.jp）

講演番号：4J02-07
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:30～ ミーティングルーム J

CNBP による mTORC1 活性化機構の解析
Analysis of mTORC1 upregulation mechanism by CNBP
○中川 晃貴[1]、島村 勝太[2]、松本 雄宇[1,2]、鈴木 司[1,2]、井上 順[1,2]、山本 祐司[1,2] ([1]東農大院・農・農化、[2]東農大・応生・農化)
○Koki NAKAGAWA[1], SYOTA SHIMAMURA[2], YU MATSUMOTO[1,2], TSUKASA SUZUKI[1,2], JUN INOUE[1,2], YUJI YAMAMOTO[1,2] ([1]Tokyo Univ Agric Grad Sch., [2]Tokyo Univ Agric.)

【背景・目的】mTORC1 はセリン/スレオニンキナーゼであり、細胞の恒常性に重要な役割を持つ。mTORC1 の活性化には、リソソームに局在する GTPase である Rheb 及び Rag が重要である。Rheb はインスリン刺激によって活性化し、mTORC1 を活性化する。また、Rag は細胞内のアミノ酸経路によって活性化して mTORC1 を細胞質から Rheb が局在するリソソームに局在化させる。これまでに我々は mTORC1 を活性化する因子を探索し、新たに Cellular nucleic acid-binding protein (CNBP) を見出した。そこで CNBP による mTORC1 の活性化及び活性制御機構の解明を本研究の目的とした。
【方法】培養細胞内における mTORC1 の活性の指標として mTORC1 の基質である S6K のリン酸化を Western blot 法にて解析した。また、CNBP がインスリンシグナルの中間因子に及ぼす影響を Akt, TSC2 のリン酸化を解析した。アミノ酸経路への影響を検討するために、HEK293T 細胞および HeLa 細胞に CNBP を過剰発現させた後、アミノ酸欠乏条件下における mTORC1 活性および mTOR の細胞内局在を蛍光免疫染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。
【結果･考察】CNBP の過剰発現によって mTORC1 活性の上昇が確認でき、さらにアミノ酸欠乏状態においても mTORC1 活性の上昇および、mTORC1 の細胞内局在変化も観察された。一方、CNBP 過剰発現による Akt、TSC2 のリン酸化の変化は認められなかったことから、CNBP はアミノ酸経路に関与することが示唆された。今後は、CNBP がアミノ酸経路にどのように関与しているのかを解析する予定である。

mTORC1 is a Ser/Thr protein kinase that plays a critical role in the cell growth and proliferation. We have found that Cellular nucleic acid-binding protein (CNBP) enhances mTORC1 activity, however, the molecular mechanism by which CNBP activates mTORC1 remains unclear.

We found that overexpression of CNBP leads to activation of mTORC1 and alters the intracellular localization of mTOR under amino acid starvation. For the effect of CNBP on insulin signaling pathway, the phosphorylation of Akt and TSC2 was not induced by overexpression of CNBP. We will analyze how CNBP is involved in the amino acid pathway.

mTORC1, CNBP, Amino acid

発表責任者：山本祐司（yujiya@nodai.ac.jp）

講演番号：4J02-08
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:30～ ミーティングルーム J

AMPK は SRSF9 をリン酸化することでβ-catenin のタンパク質合成を制御する

AMPK regulates β-catenin protein synthesis by phosphorylating SRSF9

○松本 英里[1]、松本 雄宇[1,2]、鈴木 司[1,2]、井上 順[1,2]、山本 祐司[1,2] ([1]東農大院・農・農化、[2]東農大・応生・農化)
○Eri Matsumoto[1], Yu Matsumoto[1,2], Tsukasa Suzuki[1,2], Jun Inoue[1,2], Yuji Yamamoto[1,2] ([1]Tokyo Univ. Agric., Grad. Sch., [2]Tokyo Univ. Agric.)

【目的】Wnt/β-catenin シグナル伝達経路の異常は、細胞増殖などに関わる遺伝子の発現を上昇させることで、腫瘍の悪性化を引き起こしており、実際に、様々な腫瘍組織においてβ-catenin タンパク質量の増加が認められている。近年の報告から、がん原遺伝子である serine/arginine-rich splicing factor 9 (SRSF9)がβ-catenin の mRNA と結合して mechanistic target of rapamycin (mTOR)依存的な翻訳を活性化させることが明らかとなっている。しかし、SRSF9 とβ-catenin の mRNA との結合が制御される分子機構については不明である。本研究では、リン酸化酵素である AMP-activated protein kinase (AMPK)が SRSF9 をリン酸化する可能性を見出し、これが SRSF9 を介したβ-catenin タンパク質合成に及ぼす影響について明らかにすることを目的とした。
【実験方法】^{32}P を用いた *in vitro* kinase assay により SRSF9 のリン酸化部位の同定を試みた後に、培養細胞内でも AMPK による SRSF9 のリン酸化を解析するために、抗リン酸化 SRSF9 抗体を樹立し、ウェスタンブロッティング法による解析を行った。次に、β-catenin 配列における SRSF9 結合部位を予測し、RNA 免疫沈降法で SRSF9 とβ-catenin mRNA の結合について解析した。最後に、AMPK が SRSF9 をリン酸化することによる SRSF9 依存的なβ-catenin タンパク質合成の変動について解析を行った。
【結果】AMPK は SRSF9 の Ser123 をリン酸化していることが明らかとなった。β-catenin のエクソン 8 と SRSF9 が特異的に結合し、*in vitro* においてこの結合は AMPK による SRSF9 のリン酸化によって阻害された。さらに、強制発現系において AMPK が SRSF9 をリン酸化することで SRSF9 依存的なβ-catenin タンパク質合成が抑制された。本研究によって AMPK が SRSF9 を介してβ-catenin の異常蓄積を抑制することが示唆されたことから、β-catenin の異常蓄積が原因で起こる腫瘍の悪性化が AMPK 活性化剤等によって抑制される可能性が考えられる。

Overexpression and mutations of proteins associated with the Wnt signals cause the development and progression of cancer by promoting the transcription of oncogenes. In fact, the accumulation of β-catenin is found in various tumor tissues. A recent study shows that proto-oncogene SRSF9 promotes the synthesis of β-catenin via binding β-catenin mRNA and enhancing its translation in an mTOR-dependent manner. Here, we show that the AMPK-dependent phosphorylation of SRSF9 inhibits the binding of SRSF9 to β-catenin mRNA and suppress β-catenin protein synthesis caused by SRSF9 overexpression.

AMPK, SRSF9, β-catenin

発表責任者：山本祐司（yujiya@nodai.ac.jp）

講演番号：4J02-09
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:30～ ミーティングルーム J

腸内細菌叢を介したアンドロゲンのエネルギー代謝調節

Regulation of energy metabolism by androgens through changes in gut microbiota composition

○原田 直樹[1]、花田 一貴[1]、南 友香梨[1]、乾 博[2]、山地 亮一[1]([1]大阪府大・生命環境、[2]大阪府大・栄養)
○Naoki HARADA[1], Kazuki HANADA[1], Yukari MINAMI[1], Hiroshi INUI[2], Ryoichi YAMAJI[1] ([1]Div. Life Environ. Sci., Osaka Pref. Univ., [2]Div. Nutr., Osaka Pref. Univ.)

【目的・背景】男性ホルモンであるテストステロンの減少は、肥満症や 2 型糖尿病のリスクを上昇させる。近年、腸内細菌叢がエネルギー代謝に影響することに加え、腸内細菌叢に性ホルモンが影響することが明らかになってきた。本研究では、アンドロゲン受容体ノックアウト（ARKO）マウスを用いて、エネルギー代謝へ及ぼす男性ホルモンの作用と腸内細菌叢の影響について検討した。
【方法・結果】全身 ARKO および同腹仔の Control マウスを作製し、①雄通常食、②雄高脂肪食（HFD）、③雄 HFD +抗生物質、④雌 HFD 群を設けて検討した。その結果、②雄 HFD 時に、ARKO 群で食餌効率（体重増加量／摂取カロリー量）が顕著に増加して肥満を呈し、高血糖やインスリン抵抗性、肝肥大や脂肪肝、大腿筋減少が生じた。これらの現象は①通常食時や③抗生物質摂取、④雌では観察されず、HFD を摂取させた雄で特徴的であった。皮下脂肪は雌雄、食餌、抗生物質の有無に関わらず ARKO により増加したが、内臓脂肪は、細胞肥大を伴った重量増加が②雄 HFD 時にのみ ARKO により誘導された。さらに、②雄 HFD 時に ARKO により寿命も短縮した。次世代シーケンサーによる解析により、②雄 HFD 時には ARKO により腸内細菌叢が顕著に異なることが判明し、特に *Turicibacter* 属細菌が、②雄 HFD 時にのみ ARKO で増加した。以上の結果から、ARKO マウスでは HFD 摂取時に雄特異的に内臓脂肪性肥満、高血糖、脂肪肝、筋量減少が生じ、これは腸内細菌叢の変化を介して生じることが明らかになった。（Harada ***et al.***, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 318, E525-E537, 2020.）

【Objectives】Decrease of the male hormone testosterone causes type 2 diabetes and obesity. Recent studies show that the composition of gut microbiota effects energy metabolism and is different between sexes. Here, we examined the effects of gut microbiota composition on androgen deficiency-induced energy disorders using androgen receptor knockout (ARKO) mice.
【Results】Control and ARKO mice were divided into the following groups: ① male standard diet, ② male HFD, ③ male HFD + antibiotics, and ④ female HFD. Male ARKO mice caused metabolic disorders in sex- and HFD-dependent manners, whereas antibiotics supplementation prevented the development of metabolic disorders. In addition, the ARKO mice with metabolic abnormalities had a shortened life-span. Gut microbiota compositions were significantly changed by ARKO in a HFD-fed male mice. These results indicate that ARKO mice exhibit male specific metabolic disorders upon a HFD intake through changes in the gut microbiota composition.

androgen, gut microbiota, energy metabolism

発表責任者：原田直樹（harada@biochem.osakafu-u.ac.jp）

講演番号：4J02-10
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:30～ ミーティングルーム J

唾液ムチン 10 の糖鎖修飾と糖転移酵素発現に及ぼすアンドロゲンの作用

The role of androgens in salivary mucin 10 glycosylation and glycosyltransferase expressions in the salivary glands

○出南 真奈[1]、原田 直樹[1]、乾 博[2]、山地 亮一[1] ([1]大阪府大生命環境、[2]大阪府大栄養)
○Mana DEMINAMI[1], Naoki HARADA[1], Hiroshi INUI[2], Ryoichi YAMAJI[1] ([1]Div. life Environ. sci./Osaka pref. Univ., [2]Div. Nutr./Osaka pref. Univ.)

【目的】マウス唾液中に含まれるムチン 10（MUC10）は、抗菌活性を持つヒト MUC7 のオルソログである。当研究グループでは MUC10 の SDS-PAGE による見かけの分子量に、性差とアンドロゲンによる影響を見出している。本研究では糖鎖構造および唾液腺における糖鎖修飾機構に着目し、MUC10 に対するアンドロゲンの作用を明らかにすることを目的とした。
【方法・結果】マウスから唾液を採取して MUC10 糖鎖を解析した結果、ノイラミニダーゼによるバンドシフトやレクチン MAL-I の結合量の差から、アンドロゲンが MUC10 のシアル酸修飾に関与することが示唆された。そこで、MUC10 を産生・分泌する顎下腺における糖転移酵素の発現について、去勢、雌、アンドロゲン受容体ノックアウト（ARKO）雄性マウスとこれらにテストステロンを投与したマウスをコントロール雄マウスと比較した。*O*-結合型糖鎖の主要なコア形成に関わる糖転移酵素の発現には、アンドロゲンの影響は認められなかった。一方で、糖鎖末端に見られるシアル酸の転移酵素である *St3gal1* および *St3gal4* の発現が AR を介したアンドロゲンの作用により抑制されることが明らかとなった。これらの結果から、シアル酸転移酵素の発現がアンドロゲンによって抑制されることで、MUC10 糖鎖に性差が生じ、共生細菌の雌雄差を生じる可能性を見出した。

【Aims】Mucin 10 (MUC10) is a salivary protein in rodents and is an ortholog of human MUC7 which possesses anti-bacteria properties. We have found that androgens affect the apparent molecular weight of MUC10 measured by an SDS-PAGE. In this research, we investigated the glycosylation of MUC10 by focusing on the transglycosylation in the salivary glands.
【Methods and results】Saliva was collected from mice. Using neuraminidase and lectins, it is suggested that androgens alter MUC10 sialylation patterns. Subsequently, we analyzed whether androgens regulate the expressions of glycosyltransferases. In the submandibular glands which produce and secrete MUC10, androgens had no effect on the expressions of glycosyltransferases that form the main core structures of *O*-glycan. In contrast, the expressions of the sialyltransferases *St3gal1* and *St3gal4* were suppressed by androgens via the androgen receptor. Our results strongly suggest that androgens affect MUC10 glycan by altering the expressions of sialyltransferases, which could cause sex differences in the symbiotic bacterial composition.

saliva, sialyltransferase, mucin

発表責任者：原田直樹（harada@biochem.osakafu-u.ac.jp）

講演番号：4J02-11
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:30～ ミーティングルーム J

細胞分裂過程における HP1αクロモドメインとヒストン H3 の結合状態の経時観察

Time-lapse imaging of the binding state of HP1α chromodomain and histone H3 during mitosis

○佐々木 和樹[1]、鈴木 律裕[2]、中尾 洋一[2]、吉田 稔[1,3,4]([1]理研 CSRS・ケミカルゲノミクス、[2]早大先進理工化学・生命科学、[3]東大院農　応生工、[4]東大　微生物連携機構)
○ Kazuki SASAKI[1], Michihiro SUZUKI[2], Yoichi NAKAO[2], Minoru YOSHIDA[1,3,4] ([1]Chem. Genomics Res. Gr., RIKEN CSRS, [2]Dept. Chem. And Biochem., Waseda Univ., [3]Dept. Biotechnol., UTokyo, [4]CRIIM, UTokyo)

エピジェネティクスの中心を担うヒストン修飾は、認識するタンパク質をリクルートすることで、遺伝子発現やクロマチン構造変化を制御している。ヒストン H3K9 のトリメチル化(H3K9me3)と結合する HP1αは、その結合ドメインであるクロモドメイン(CD)と二量化ドメインであるクロモシャドウドメイン(CSD)からなり、この HP1αCD と H3K9me3 の結合及び CSD による HP1αの二量化がクロマチンの高次構造形成に寄与していると考えられている。細胞分裂期での H3K9me3 の変化とそれによる HP1αCD の結合状態がどうなっているのかを多くの研究者が解析しようとしてきたが、従来の多数の細胞を同調させた解析では、時間分解能の高い解析は不可能であった。そこで、生細胞内での H3K9me3 と HP1αCD 及び全長 HP1αの結合状態変化をリアルタイムに解析する FRET を利用した蛍光プローブを開発し、細胞分裂の際の応答を観察した。HP1αCD と全長 HP1αを用いた蛍光プローブでは、結合の解離の際に異なる応答が見られ、この応答の違いを検証するために、表面プラズモン共鳴を用いてヒストン H3 の修飾ペプチドと HP1αの各ドメインとの結合を調べた結果、細胞分裂前期の H3K9me3 の急速な上昇と、それに続く細胞分裂中期の隣接する H3S10 のリン酸化、それに伴う HP1αCD との相互作用の低下というダイナミックな変化が起こっていることが明らかになった。

Epigenetics is generally defined as heritable changes in gene expression, which are independent of the genome sequence. Histone H3K9 tri-methylation (H3K9me3) acts as a crucial epigenetic mark that recruits HP1, which is functionally involved in constitutive heterochromatin formation and transcriptional silencing. While the methylation of H3K9 is dynamically modulated, spatiotemporal information on histone H3K9me3 in living cells remains limited due to the lack of experimental tools. In this study, we created FRET-based probes for live-cell imaging using the full-length HP1α and HP1α chromodomain (HP1αCD), which binds to H3K9me3. Using these fluorescent probes, we observed changes in the FRET signal during mitosis. Furthermore, the binding of each domain of HP1α to modified H3 peptides was examined by SPR. These results revealed that a rapid increase in H3K9me3 occurs in prophase, followed by phosphorylation of adjacent H3S10 in prometaphase and a concomitant decrease in interaction with HP1αCD.

Histone K9 tri-methylation, HP1, FRET

発表責任者：佐々木和樹（kzsasaki@riken.jp）

講演番号：4J02-12
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:30～ ミーティングルーム J

「ソルビン酸由来リジン修飾による遺伝子発現制御機構の解明」
「Elucidation of the regulatory mechanism of gene expression via sorbic acids derived novel lysine modification」
○清水 勇希[1]、則次 恒太[1]、鈴木 健裕[2]、小池 晃太[3]、どど 孝介[3,4]、袖岡 幹子[3,4]、堂前 直[2]、伊藤 昭博[1]([1]東薬大　生命科学、[2]理研 CSRS　生命分子解析、[3]理研 CPR　袖岡有機合成化学、[4]理研 CSRS　触媒・融合研究)
○Yuki SHIMIZU[1], Kota NORITSUGU[1], Takehiro SUZUKI[2], Kota KOIKE[3], Kosuke DODO[3,4], Mikiko SODEOKA[3,4], Naoshi DOHMAE[2], Akihiro ITO[1] ([1]Tokyo Univ. of Pharm. and Life Sci., [2]Biomolec. Character. Unit, RIKEN CSRS, [3]Synthetic Org. Chem. Lab, RIKEN CPR, [4]Cat. and Integrated. Group, RIKEN CSRS)

アセチル化に代表されるリジン残基の多様なアシル化修飾は、エピジェネティックな遺伝子発現制御に関わり、生命の根幹となる生命現象の調節を担っている。これらのアシル化修飾は、主に脂肪酸などの内在性カルボン酸に由来するアシル CoA 依存的に引き起こされるが、内在性のカルボン酸のみリジン残基に修飾されるのであろうか？ 我々は日々様々なカルボン酸に曝露されており、例えば、食事とともに摂取している食品添加物には 100 種類以上のカルボン酸が含まれる。その中には、内在性のカルボン酸と同様に標的タンパク質のリジン残基をアシル化修飾するものがあるのではないか？ この問に答えるために、我々は食品添加物由来のカルボン酸を HepG2 細胞に処理し、食品添加物に由来する修飾がヒストンタンパク質のリジン残基上に生じるかどうか、LC-MS/MS 解析で検討した。その結果、保存料として使用されているソルビン酸によりヒストンのリジン残基がアシル化修飾（ソルビル化）されることを発見した。さらに、リジンソルビル化を特異的に認識する抗体の作製に成功した。本抗体を用いたウェスタンブロット法により、ヒストンのリジンソルビル化を確認した。ヒストンのリジンアシル化修飾は転写に影響を与えることが知られているが、ソルビン酸処理は遺伝子の大規模な発現変動を引き起こすことを RNA-seq 解析により明らかにした。以上の結果から、ソルビン酸はヒストンのリジン残基を修飾することにより、遺伝子発現の変動を引き起こすことが示唆された。本結果より、ソルビン酸などの食品添加物由来のカルボン酸の中には、ヒストンのリジン修飾を介して生体に影響を与えているものが存在する可能性が示唆された。

Various lysine acylations are related to epigenetic gene expression and responsible for regulation of diverse biological phenomena. Lysine acylations occur depending on acyl-CoA derived from endogenous carboxylic acids. We are exposed daily to various compounds including carboxylic acids with foods. We therefore hypothesized that lysine residues may be similarly modified by these exogenous carboxylic acids *in vivo*. In this presentation, we report lysine sorbylation on histones induced by sorbic acid, a popular food preservative. Importantly, RNA-seq analysis revealed that sorbic acid induced alteration in gene expression. These results suggested that carboxylic acids in food additives affect gene expression via lysine acyl modifications on histones.

Epigenetics, Lysine acylation, Food additive

発表責任者：伊藤昭博（aito@toyaku.ac.jp）

講演番号：4J02-13
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:30～ ミーティングルーム J

核内アクチン繊維形成とゲノム機能制御におけるアクチンファミリーArp4 の役割

The actin-family protein Arp4 suppresses formation of nuclear actin filament

○上野 佑也[1]、山崎 祥他[2]、GERHOLD Christian[3]、山本 浩志[1]、宮本 圭[4]、原田 昌彦[1]([1]東北大・院農、[2]理研、[3]FMI、[4]近大・院生物理工)
○Yuya UENO[1], Shota YAMAZAKI[2], Christian GERHOLD[3], Koji YAMAMOTO[1], Kei MIYAMOTO[4], Masahiko HARATA[1] ([1]Tohoku Univ., [2]RIKEN Center for Advanced Photonics, [3]FMI, [4]Kinki Univ.)

アクチンファミリータンパク質はアクチンとアクチン関連タンパク質(Arps)から構成され、Arp は 10 種類のサブファミリー(Arp1~Arp10)に分類される(1)。細胞質でのアクチン繊維形成は、Arp2 と Arp3 の複合体(Arp2/3 複合体)により制御されている。近年、遺伝子発現や DNA 損傷修復における細胞核内アクチン繊維の関与が明らかにされているが、この核内アクチン繊維形成の制御メカニズムや Arp の関与には不明な点が多い。そこで本研究では、細胞核に局在する Arp の一つである Arp4 に注目した。Arp4 はアクチンと結合し、ヘテロ二量体を形成することで、クロマチンリモデリング複合体の構成因子となる。この性質から、Arp4 が核内アクチン繊維形成を阻害している可能性を考えた。細胞内の Arp4 を RNA 干渉によりノックダウン（Arp4 KD）したところ、核内のアクチン繊維が観察された。また、体細胞核の遺伝子初期化過程でのアクチン繊維形成が、精製 Arp4 のインジェクションにより阻害された。さらに、Arp4 KD による核内アクチン繊維の出現に伴い、遺伝子発現パターンの変化や、DNA 損傷修復反応の変化が観察された（2）。これらの結果から、Arp4 が核内アクチン繊維形成の抑制を介して、エピジェネティクス制御に関与することが示された。

The actin family is composed of actin and actin-related proteins (Arps), which are classified into ten subfamilies, Arp1 to Arp10 (1). Arp2 and Arp3 form the core of the Arp2/3 complex, which binds to actin and facilitates actin polymerization in the cytoplasm. Whereas nuclear actin filaments play essential roles in gene expression and DNA damage repair, little is known about the regulation of nuclear actin dynamics regulation. In this study, we focused on Arp4, which is one of the nuclear accumulated Arps. Arp4 is an integral subunit of multiple chromatin remodeling complexes and forms a heterodimer with monomeric actin in these complexes. Therefore, we hypothesized that Arp4 is a novel suppressor of nuclear actin polymerization. We demonstrated that Arp4 knockdown (Arp4 KD) led to an increase in the formation of nuclear actin filaments and that purified Arp4 decreased nuclear actin filaments during gene reprogramming. Moreover, Arp4 KD facilitated the expression of genes which is induced by nuclear actin filament and affected DNA-damage repair processes (2). These results show that Arp4 has a role in epigenetic regulation as a novel suppressor of nuclear actin filaments.

References:
1, Oma Y, Harata M, Nucleus, 2: 38-46, 2011.
2, Yamazaki S, Gerhold C, Yamamoto K, Ueno Y, Grosse R, Miyamoto K, Harata M, Cells, 9: 758, 2020.

nuclear actin, actin-related protein, epigenetics

講演番号：4J02-14
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:30～ ミーティングルーム J

INK4 遺伝子座から転写される 2 つの長鎖ノンコーディング RNA の機能解析

The functional analysis of two long noncoding RNAs transcribed from INK4 locus

○神武 洋二郎、松永 夏実、岡田 凌太朗 (近大院産理工)
○Yojiro Kotake, Natsumi Matsunaga, Ryotaro Okada (Kindai Univ.)

INK4 遺伝子座には 3 つの重要な癌抑制遺伝子が存在する。これらの遺伝子は CDK インヒビターp15、p16 及び p53 安定化因子 ARF をコードしている。*INK4* 遺伝子座は、多くの癌において、遺伝子欠損、変異、転写抑制がみられる。これまでに我々は、*INK4* 遺伝子座に 2 つの機能性長鎖ノンコーディング RNA、*ANRIL* と *ANROC* が存在することを明らかとした。我々は、*ANRIL* が転写抑制因子であるポリコームタンパク質複合体と結合し、*INK4* 遺伝子座へのポリコームタンパク質複合体結合を促進することにより、*INK4* 遺伝子座の転写抑制に関与していることを報告した。さらに最近我々は、*ANRIL* が各種癌細胞で高発現していること、各種癌細胞で *ANRIL* をノックダウンすると、*p15* 及び *p16* の mRNA 量が増加し、細胞増殖が顕著に抑制されることを明らかとした。これらの結果から、*ANRIL* は癌遺伝子として働いている可能性が考えられた。さらに最近我々は、*INK4* 遺伝子座から転写される新規長鎖ノンコーディング RNA（*ANROC* と命名）を同定した。子宮頸癌細胞 HeLa 及び舌癌細胞 CAL27 において、*ANROC* をノックダウンすると、M 期促進因子であるサイクリン B1 の mRNA 量が増加し、細胞増殖が促進することを明らかとした。これらの結果から、*ANRIL* とは逆に、*ANROC* は細胞増殖を抑制する機能を持つことが考えられた。本発表では *ANRIL* と *ANROC* について、最近の知見を伴わせて紹介したい。

INK4 locus is located on human chromosome 9p21 region and encodes three tumour suppressor genes, CDK inhibitor *p15*, *p16* and p53 stabilizing factor *ARF*. This locus is mutated, deleted, and transcriptionally suppressed in a wide range of human cancers. We found two functional long noncoding RNAs, *ANRIL* and *ANROC* transcribed from *INK4* locus so far.

We have reported that *ANRIL* associates with polycomb proteins complex and recruits it on the *INK4* locus, leading to the transcriptional repression of *INK4* locus. Recently, we showed that *ANRIL* is highly expressed in several cancer cells compared to normal cells. Silencing *ANRIL* inhibited the proliferation of several cancer cells. These results suggest that *ANRIL* functions as an oncogene. Recently, we found another novel long noncoding RNA, *ANROC*, on the *INK4* locus. We showed that silencing *ANROC* increases the mRNA levels of *cyclin B1*, resulting in the promotion of HeLa cells proliferation. These results suggest that ANROC functions to repress cell proliferation.

INK4 locus, CDK innhibitor, long noncoding RNA

講演番号：4J02-15
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 09:30～ ミーティングルーム J

mRNA 核外輸送因子 UAP56 と URH49 による mRNA スプライシング制御機構の解明

mRNA splicing regulated by UAP56 and URH49 ,the two closely related mRNA nuclear export helicases.

○池田 宥哉[1]、藤田 賢一[2]、吉岡 英恵[1]、増田 誠司[1] ([1]京都大学、[2]藤田医大)
○Yuya Ikeda[1], ken-ichi Fujita[2], Hanae Yoshioka[1], seiji Masuda[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Fujita Health Univ.)

真核生物の遺伝子発現の過程におけるスプライシングは、数多くの因子によって精密に制御されている。この制御が破綻すると ALS などの RNA 病やがんの原因となる事が知られており、その制御機構の解明が期待されている。

DEAD-box 型 RNA ヘリカーゼである UAP56 とそのパラログである URH49 は共に mRNA 核外輸送因子として機能するが、標的 mRNA には違いがある。また UAP56 はスプライシング制御に働くことがいくつかの遺伝子で報告されているが、URH49 についてはわかっていない。本研究は、UAP56 と URH49 が mRNA 輸送に加え、スプライシングの制御にもゲノムワイドに働く事を示し、両者の機能明らかにする事を目的としている。RNAseq 解析により、UAP56 と URH49 の特異的ノックダウンによって、スプライシングパターンの変化が異なることを発見した。中でも retained intron が生じた mRNA 群は核外輸送が阻害される事を観察した。このような変化は、最終的な輸送因子である NXF1 をノックダウンしても観察されなかった。加えて、ダブルノックダウンや過剰発現による観察から UAP56 と URH49 の存在量が選択的スプラシング制御に寄与する可能性が示唆された。この解析により、これまでの概念とは違って UAP56 と URH49 は mRNA 輸送の前のスプライシング段階から働くことで輸送標的 mRNA 群の識別に寄与する可能性がある事、加えてトランスクリプトームの多様性に貢献することが示された。

In human, closely related RNA helicases, UAP56 and URH49 promotes nuclear export of distinct subsets of mRNAs. It has been reported that UAP56 also regulates the splicing of several mRNAs *in vitro*, but the function of UAP56 and URH49 in splicing step is unclear. In this study, RNA-seq analysis revealed that specific knockdown of UAP56 and URH49 leads alternative splicing change in different mRNA species. mRNAs with retained intron was not exported to the cytoplasm. This phenotype was not observed when NXF1, acted on the final mRNA export step, was knocked down, suggesting that the splicing regulation is a specific function of UAP56 and URH49. Moreover, double knockdown and overexpression of these factors implicated that these protein expressions in the cell seemed to influence on splicing. These results raised a novel concept that the function of UAP56 and URH49 in the mRNA splicing step contributed to transcriptome diversity, selective mRNA recognition at the splicing step and export.

mRNA exporter, Splicing regulation, alternative splicing

講演番号：4J04-01
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:30～ ミーティングルーム J

メバロン酸経路はヒト iPS 細胞由来骨格筋細胞においてタンパク質恒常性を制御する

Blocking mevalonate pathway impairs protein homeostasis in human iPS cell-derived myocytes

○ZHAO XIAOLIN[1]、久保 美遥[1]、櫻井 英俊[2]、佐藤 隆一郎[1]、山内 祥生[1] ([1]東大院・農生科・応生化、[2]京大・CiRA)
○ XIAOLIN ZHAO[1], Miharu KUBO[1], Hidetoshi SAKURAI[2], Ryuichiro SATO[1], Yoshio YAMAUCHI[1] ([1]Dept. of Appl. Biol. Chem., Grad. Sch. of Agr. and Life Sci., Univ. of Tokyo, [2]CiRA, Univ. of Kyoto)

動脈硬化治療薬であるスタチンは、コレステロール合成の律速酵素である HMG-CoA 還元酵素の阻害剤である。スタチンは、心血管イベントのリスクを軽減する優れた作用を有する一方、その副作用として横紋筋融解症をはじめとする筋障害を引き起こすことが知られており、骨格筋におけるメバロン酸経路の重要性が示唆されている。しかしながら、メバロン酸経路を介した骨格筋恒常性維持の分子機構は不明な点も多く、特にヒト骨格筋細胞を用いた報告は極めて少ない。本研究では、ヒト iPS 細胞由来骨格筋細胞を用いて、骨格筋におけるタンパク質の恒常性維持に果たすメバロン酸経路の役割について解析を行った。ヒト iPS 由来骨格筋細胞をセリバスタチンで処理することで、筋細胞障害が認められた。また、セリバスタチンは骨格筋細胞におけるタンパク質分解に重要なユビキチンリガーゼである Atrogin-1 の発現を惹起することが示された。一方、メバロン酸を加えることで、セリバスタチンによる細胞障害と Atrogin-1 の発現増加はキャンセルされた。さらに、ヒト iPS 細胞由来骨格筋細胞をセリバスタチンで処理することで、タンパク質合成が抑制されることが示された。骨格筋量は、主にタンパク質の合成と分解によって制御されている。以上の結果から、メバロン酸経路は骨格筋細胞におけるタンパク質恒常性を制御する重要な代謝経路であることが示唆された。

Statins are widely used for treating atherosclerosis and cardiovascular disease (CVD) by inhibiting HMG-CoA reductase, the rate-limiting enzyme in the cholesterol biosynthesis pathway. On the other hand, statins are reported to cause muscle symptoms such as myalgia, myopathy and rhabdomyolysis, indicating that mevalonate pathway is critical in skeletal muscle. However, mechanisms by which mevalonate pathway regulates skeletal muscle homeostasis are poorly understood. In this study, we analyzed the role of mevalonate pathway in maintaining skeletal muscle proteostasis using human iPS cell (hiPSC) -derived myocytes. Cerivastatin treatment caused cell toxicity and suppressed protein synthesis in hiPSC-derived myocytes. Furthermore, cerivastatin induced the expression of Atrogin-1, a ubiquitin E3 ligase important for proteolysis in skeletal muscle. All these effects of cerivastatin were reversed by addition of mevalonate. These results suggest that the mevalonate pathway is an important metabolic pathway in maintaining skeletal muscle proteostasis.

hiPSC, mevalonate pathway, muscle proteostasis

発表責任者：ZHAO XIAOLIN（xiaolinzhao@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：4J04-02
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:30～ ミーティングルーム J

ヒト iPS 細胞由来骨格筋細胞を利用した Myostatin と GDF11 の活性評価

A role for Myostatin and GDF11 in muscle atrophy using human iPS cell-derived myocytes

○本多 美香子[1]、櫻井 英俊[2]、佐藤 隆一郎[1]、山内 祥生[1]([1]東大院・農生科・応生化、[2]京大・CiRA)
○Mikako HONDA[1], Hidetoshi SAKURAI[2], Ryuichiro SATO[1], Yoshio YAMAUCHI[1] ([1]Dept. of Appl. Biol. Chem., Grad. Sch. of Agr. and Life Sci., Univ. of Tokyo, [2]CiRA, Univ. of Kyoto)

体重の 40%程度を占める骨格筋は、運動機能を発揮する上で必須の役割を果たすほか、糖代謝などの全身の代謝恒常性の上でも重要な役割を果たしている。加齢に伴う筋萎縮は要介護のリスク因子となっており、骨格筋量を維持することは健康寿命の延伸につながると期待されている。骨格筋量は筋タンパク質の分解と合成のバランスによって調節されており、加齢などによって分解が合成を上回ると骨格筋量は減少し、筋萎縮を引き起こす。Myostatin(MSTN)は TGF-βファミリーに属する骨格筋量を負に調節する最も主要な因子である。近年、Myostatin と 90％の相同性を有する Growth Differentiation Factor-11(GDF11)もまた筋萎縮を引き起こす因子として報告された。しかし、GDF11 には骨格筋機能を改善するという報告もある。また、GDF11 の血中濃度は MSTN の 1/10 程度に過ぎないが、これまでの報告では生理的濃度を逸脱した濃度で機能が検証されており、骨格筋における GDF11 の役割は不明な点が多い。そこで、我々はヒト iPS 細胞由来骨格筋細胞を用いて MSTN および GDF11 の効果を検証する評価系の確立を試みた。その結果、ヒト iPS 細胞由来骨格筋細胞は C2C12 筋管細胞に比べて MSTN や GDF11 に対してより感受性が強く、その効果はヒト初代骨格筋細胞と同程度であることが認められた。これらの結果から、ヒト iPS 細胞由来骨格筋細胞は MSTN や GDF11 の活性を評価する優れたヒト骨格筋細胞モデルになると考えられた。

Skeletal muscle is an important tissue both in exercise and metabolism, and maintaining skeletal muscle mass is linked to an increase in healthy life expectancy. Myostatin (MSTN) is a member of the TGF-beta family factors, and negatively regulates skeletal muscle mass. It has been shown that growth differentiation factor-11 (GDF11), whose amino acid sequence is 90% homologous to Myostatin, also causes muscle atrophy. However, since there is a report showing its positive effect on skeletal muscle, a role of GDF11 in the skeletal muscle remains controversial. In addition, the blood concentration of GDF11 is only 1/10 of MSTN, but the above studies used supra-physiological concentration of GDF11. To validate physiological role of GDF11 and MSTN, we have attempted to utilize human iPS cell-derived myocytes as a model for human skeletal muscle cells.

Myostatin, GDF11, skeletal muscle

講演番号：4J04-03
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:30～ ミーティングルーム J

筋サテライト細胞が速筋線維に分化するのに必要な転写因子群の同定

Identification of transcription factors that are necessary for muscle satellite cells to differentiate into fast muscle fibers

○大平 悠人[1]、藤田 真理子[1]、瀧川 花穂[1]、吉岡 潔志[2]、小野 悠介[2]、亀井 康富[1]([1]京都府大・生命環境、[2]熊本大・発生医学研究所)
○Yuto OHIRA[1], Mariko FUJITA[1], Kaho TAKIGAWA[1], Kiyoshi YOSHIOKA[2], Yusuke ONO[2], Yasutomi KAMEI[1] ([1]Kyoto Prefectural Univ., [2]Kumamoto Univ.)

骨格筋を構成する筋線維は速筋線維と遅筋線維に分けられる。速筋線維は糖利用に優れ、遅筋線維は脂質利用に優れている。筋サテライト細胞は未分化の骨格筋幹細胞で骨格筋の再生に深く関与する。速筋線維の筋サテライト細胞は速筋線維に、遅筋線維の筋サテライト細胞は遅筋線維に分化する。しかし、この分子メカニズムは不明な点が多い。また加齢性筋萎縮であるサルコペニアでは速筋優位の萎縮が起こるがその原因は明らかではない。

本研究では速筋・遅筋由来の筋サテライト細胞を単離してマイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を行い、速筋で発現が高い転写因子類を見出した。また、それらの転写因子類を速筋由来の筋サテライト細胞でノックダウンして分化させたところ、速筋型のミオシン重鎖の遺伝子発現が減少し、遅筋型のミオシン重鎖の遺伝子発現が増加し、遅筋様に変化した。さらにそれらの筋サテライト細胞でマイクロアレイ・qRT-PCR を行なったところ、糖利用関連遺伝子の発現が減少し、脂質利用関連遺伝子の発現が増加し、遅筋様の変化が観察された。

本研究では筋サテライト細胞の速筋線維への分化に必要な転写因子類を同定した。サルコペニアのような速筋優位な筋萎縮の治療に本研究は役立つと考えられる。

Skeletal muscle can be divided into slow and fast muscles. Fast muscles preferentially use glucose, and slow muscles preferentially use fatty acids as energy sources. Muscle satellite cells are undifferentiated muscle stem cells and are involved in muscle regeneration. Muscle satellite cells of fast muscles differentiate into fast muscle fibers, and those of slow muscles differentiate into slow muscle fibers. During sarcopenia, muscle atrophy occurs dominantly in fast muscles. However, its mechanism is still unclear. In this study, we isolated satellite cells from fast and slow muscles, and performed comprehensive gene expression analysis. We identified transcription factors, which were expressed higher in satellite cells derived from fast muscle than those from slow muscle. Knockdown of these factors in satellite cells induced fast to slow muscle fiber type change. Furthermore, gene expression of glucose metabolism-related genes was downregulated, and that of lipid metabolism-related genes was upregulated. In this study, we identified transcription factors, which were necessary for muscle satellite cells to differentiate into fast muscles. Our study may be useful in treatment for fast muscle dominant atrophy such as sarcopenia.

Satellite cells, skeletal muscle, transcription factors

講演番号：4J04-04
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:30～ ミーティングルーム J

老化筋芽細胞の分化不全・筋萎縮形質は、細胞外小胞を介して周辺細胞に伝播する

Muscle atrophy traits of senescence myoblast can be transmitted to surrounding cells via their extracellular vesicles.

杉村 友梨、服部 秀美、○江藤 望（宮崎大農）
Yuri SUGIMURA, Hidemi HATTORI, ○Nozomu ETO (Univ. of Miyazaki)

【背景】老化関連疾患の 1 つであるサルコペニアは、加齢に伴う骨格筋の量や機能の低下を特徴とする。サルコペニア発症における老化細胞の役割を検討するため、我々はマウス骨格筋芽細胞(C2C12)の *BubR1* を低発現させた老化誘導筋芽細胞(BKD12)を樹立した。BKD12 は老化傾向、分化能低下、同化経路抑制、異化経路亢進等の性質を有しており、筋修復能力の低下や筋タンパク質代謝バランスの不均衡を示すサルコペニアと類似した特徴を持っている。
【目的】老化関連疾患の発症を促進する一因として、老化細胞と周辺細胞との細胞間作用が考えられている。そこで、BKD12 の形質が周辺細胞に伝播し得るかどうか解析することを目的とした。
【方法・結果】BKD12 由来細胞外小胞(BKD-EV)を C2C12 に添加すると、BKD12 側で生じていた分化能の低下や異化経路の亢進が C2C12 側でも同様に観察された。また、BKD12 側で発現変動していた miRNA が BKD-EV 添加 C2C12 でも同様に発現変動していた。これは、BKD-EV を介して輸送されたものが C2C12 の筋タンパク質代謝関連遺伝子を負に制御することを示唆するものと考えられた。
【結論】老化細胞の細胞老化関連分泌現象(SASP)は一般的に細胞から直接分泌されるタンパク質を指すが、本研究では EV を介しても負の影響を周辺の細胞に及ぼしている可能性が示唆された。

[Background and Purpose] To investigate senescent cells' role in the development of sarcopenia, we established senescence-induced myoblasts (BKD12) with low expression of BubR1 in mouse skeletal myoblasts (C2C12). BKD12 has properties such as aging tendency, decreased differentiation potential, suppression of the anabolic pathway, and enhancement of the catabolic pathway. And it has characteristics similar to sarcopenia, which shows a decrease in muscle repairability and an imbalance in muscle protein metabolism balance. We aimed to analyze whether the trait of BKD12 could be transmitted to the surrounding cells.
[Methods and results] BKD12-derived extracellular vesicles (BKD-EV) were added to C2C12 cells. As a result, the decrease in differentiation potential and the increase in the catabolic pathway initially occurred in BKD12 were also observed in C2C12. Also, miRNA expression fluctuated on the BKD-EV-added C2C12 cells as similar to the BKD12 cells.
[Conclusion] Senescence-associated secretory phenotype (SASP) generally refers to proteins secreted directly from cells. However, our results suggest that EV may also have a negative effect on surrounding cells.

extracellular vesicles, sarcopenia, senescent cell

発表責任者：江藤望（neto@cc.miyazaki-u.ac.jp）

講演番号：4J04-05
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:30～ ミーティングルーム J

培養細胞を用いたたばこ製品の酸化ストレス・炎症応答評価手法の構築

Development of *in vitro* test methods for analysis of oxidative stress and inflammatory responses induced by aerosols from tobacco products

○石川 晋吉、倉知 孟史、森 さくら、田邉 郁也、石森 かな江（日本たばこ産業株式会社）
○Shinkichi ISHIKAWA, Takeshi KURACHI, Sakura MORI, Ikuya TANABE, Kanae ISHIMORI (Japan Tobacco Inc.)

【目的】喫煙は慢性閉塞性肺疾患などのリスク因子とされる。動物実験などの結果から、たばこ煙は呼吸器上皮に酸化ストレスや炎症応答を引き起こし、これら応答が慢性的に生じることで肺気腫などの組織学的変化が誘発されると考えられている。たばこ製品の毒性影響評価において有用と考えられるこれらの変化を、動物実験に依らず *in vitro* で評価するための手法開発に取り組んだ。**【方法】**動物実験において呼吸器組織に与える影響が異なる二種類のたばこ（3R4F および NTV）を用意し、これらを開発した *in vitro* 試験で評価した。酸化ストレス応答評価 ヒト気管支上皮細胞株 (Beas-2B) へ ARE-Nrf2 luciferase reporter gene を導入し、3R4F または NTV のエアロゾル抽出液を含む培地で 24 時間培養した。レポーター遺伝子活性を酸化ストレス応答の指標として測定し、それぞれのたばこでの結果を比較した。炎症応答評価 ヒト初代気管支上皮細胞を気液界面培養し、生体と同様の分化状態を示す気管支上皮組織を再構成した。3R4F または NTV のエアロゾルを気相側から直接曝露し、24 時間後の培地中 IL-8 量を炎症応答の指標として、それぞれのたばこでの測定値を比較した。**【結果】**酸化ストレス、炎症応答いずれにおいても 3R4F が有意な反応を示す曝露量は NTV と比較して低値であった。この結果は動物実験の結果と同様であり、開発した手法が代替法やスクリーニング系として有用となる可能性が示唆された。

Smoking is a risk factor for inflammatory lung diseases. The results of animal experiments show that cigarette smoke induces oxidative stress and inflammatory responses in the lung epithelium in vivo. As alternatives to animal experiments, we have developed test methods to analyze these smoking-related responses *in vitro*. Oxidative stress responses were analyzed in lung cell line Beas-2B transfected with an ARE-Nrf2 luciferase reporter gene. Inflammatory responses were analyzed using a reconstructed human bronchial epithelium by the level of interleukin-8 secretion. The effects of aerosols generated from the 3R4F cigarette and a novel tobacco vapor product (NTV) were analyzed by these two methods. The results showed that aerosol from 3R4F elicited responses at lower doses than those from the NTV. These data were consistent with the results of animal testing. Thus, the developed *in vitro* methods may be useful as alternatives to animal experiments.

Lung, Oxidative stress, Inflammation

発表責任者：石川晋吉（shinkichi.ishikawa@jt.com）

講演番号：4J04-06
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:30～ ミーティングルーム J

アオコ由来毒素ミクロシスチン-LR の慢性的な低濃度曝露は大腸において JNK の活性化を介して MCP-1 の発現増加を導く

Chronic low-concentration exposure to microcystin-LR derived from the blue-green algae leads to upregulation of MCP-1 expression through activation of JNK in the colon.

○古東 義仁[1]、河原 秀明[2]、蔵田 航一[2]、吉清 恵介[3]、杉浦 則夫[4]、清水 和哉[4]、清水 英寿[3]([1]島大院・自然、[2]島大院・生資、[3]島大・学術、[4]筑波大・生環系)
○Yoshihito Koto[1], Hideaki Kawahara[2], Koichi Kurata[2], Keisuke Yoshikiyo[3], Norio Sugiura[4], Kazuya Shimizu[4], Hidehisa Shimizu[3] ([1]Grad. Sch. Nat. Sci. Tech, Shimane Univ., [2]Grad. Sch. Life. Envi. Sci, Shimane Univ., [3]Inst. Agri. Life. Envi. Sci., Aca, Ase, Shimane Univ. Shimane Univ., [4]Fac. Life Environ. Sci, Univ. of Tsukuba.)

湖沼の富栄養化に伴って異常発生するアオコから産生される毒素ミクロシスチン (Microcystin: MC) は、飲料水だけでなく、そこに生息する食用魚介類にも蓄積されるため、近年、世界的な問題となっている。現在までに、ヒトを含むほ乳動物に対する MC の高濃度曝露については多数報告されているが、慢性的な低濃度曝露による健康障害に対する影響については、未だ不明な点が多い。そこで本研究では、代表的なミクロシスチンである MC-LR に着目し、被曝組織の一つと想定される結腸に対する低濃度曝露による影響を解析することを目的とした。WKAH/HkmSlc ラットに MC-LR 含有水 (10 nM) を自由飲水により 7 週間摂取させたところ、摂食量や体重に変化は観察されなかったものの、結腸粘膜組織において、単球に対して特異的な遊走活性を示す Monocyte chemoattractant Protein-1 (MCP-1) の発現量が優位に上昇していた。加えて、分化させた結腸由来細胞株である Caco-2 細胞に 10 nM の MC-LR を処理したところ、MCP-1 の発現上昇が導かれた。さらに MC-LR によって誘導される MCP-1 の発現増加は、c-Jun N-terminal kinase (JNK) の活性化を介していることが明らかとなった。以上より、MC-LR の慢性的な低濃度曝露は、結腸において JNK の活性化を介して MCP-1 の発現増加を導き、単球を集積させることが示唆された。

A toxin called microcystin (MC) is produced in the abnormal occurrence of blue-green algae in lakes with eutrophication. Since produced MC by blue-green algae has been reported to accumulate in the edible fish as well as in drinking water from lakes, it has become a worldwide problem in recent years. Although many reports have been already published on high MC exposure to mammals including humans, health problems caused by the effects of low MC exposure remain unclear. The present study focused on a representative MC (MC-LR) to analyze the effects of low exposure to the colon. WKAH/HkmSlc rats were fed MC-LR-containing water (10 nM) for 7 weeks without any changes in food intake and body weight compared with control rats. However, focusing on the colon mucosal tissue in MC-LR-containing water fed rats, the expression levels of monocyte chemoattractant Protein-1 (MCP-1) was significantly increased. In addition, the expression levels of MCP-1 was also upregulated in 10 nM MC-LR-treated differentiated Caco-2 cells, a colon-derived cell line. Furthermore, the MC-LR-induced MCP-1 expression was found to be mediated through activation of c-Jun N-terminal kinase (JNK). Therefore, the present results suggest that exposure to low concentrations of MC-LR to the colon leads to accumulation of monocytes with upregulation of MCP-1 expression through activation of JNK.

Microcystin, MCP-1, Colon

発表責任者：清水英寿（hideshmz@life.shimane-u.ac.jp）

講演番号：4J04-07
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:30～ ミーティングルーム J

骨格筋特異的な胆汁酸受容体 TGR5 の過剰発現はグルコースクリアランスを改善する

Muscle-specific TGR5 overexpression improves glucose clearance

○佐々木 崇[1]、渡邉 雄一[1]、久保山 文音[1]、及川 彰[2]、清水 誠[1]、山内 祥生[1]、佐藤 隆一郎[1]([1]東大院農生科・応生化、[2]山形大農)
○ Takashi SASAKI[1], Yuichi WATANABE[1], Ayane KUBOYAMA[1], Akira OIKAWA[2], Makoto SHIMIZU[1], Yoshio YAMAUCHI[1], Ryuichiro SATO[1] ([1]The Univ. of Tokyo, [2]Yamagata Univ.)

肝臓で合成された胆汁酸は摂食に際し腸管に分泌され、脂溶性栄養素の吸収を助ける働きを担う。その後胆汁酸の約 95%は小腸において再吸収され、門脈を経由して再び肝臓へと輸送される。胆汁酸の大部分は肝臓に取り込まれリサイクルされるが、その一部は取り込みを免れ全身を巡るため、食後は血中胆汁酸濃度が著しく上昇することが知られている。

胆汁酸受容体 TGR5 は全身に広く発現が認められ、様々な代謝プロセスに関与することが報告されている。我々は骨格筋における TGR5 の活性化が骨格筋の肥大化や筋力の増大を誘導することを既に報告しているが (J Biol Chem 293, 10322-10332, 2018)、エネルギー代謝に及ぼす影響に関しては不明な点が多く残されていた。骨格筋 TGR5 が代謝に及ぼす影響を明らかにするため、骨格筋特異的に TGR5 を過剰発現したトランスジェニック（Tg）マウスを用いて解析を進めた。一連の実験の結果、Tg マウスは野生型（WT）マウスと比較して糖をエネルギー源として積極的に利用していることが明らかとなった。また、一般に肥満や老化は耐糖能を悪化させることが知られているが、いずれの条件においても Tg マウスは WT マウスと比較して耐糖能が良好であった。Tg マウスにおいて糖代謝が活性化した理由のひとつとして、主要な糖代謝器官である骨格筋が増大したことが挙げられる。一方、質量分析を活用したメタボライト解析の結果からは、骨格筋における解糖系フラックスの活性化が強く示唆されており、これらが相乗的に糖代謝を亢進したと予想される。以上の結果より、骨格筋 TGR5 がグルコースクリアランスの改善に寄与することが示され、同時に肥満や老化などを原因とする耐糖能異常を改善する分子ターゲットとして有望である可能性が示された。

We previously reported that activation of TGR5, a G protein- coupled bile acid receptor, in the skeletal muscle induces muscle hypertrophy (J Biol Chem 293, 10322-10332, 2018). However, the effect of TGR5 on skeletal muscle energy metabolism was not well understood.

In the present study, we explored the effects of TGR5 on muscle energy metabolism using skeletal muscle-specific TGR5 transgenic mice and found that activation of muscle TGR5 results in the improvement of glucose intolerance by increasing muscle mass and glucose utilization. Our findings indicate that activation of TGR5 in skeletal muscle is effective in improving glucose metabolism and may be beneficial in developing a novel method of prevention or treatment of hyperglycemia.

skeletal muscle, metabolism, bile acid

発表責任者：佐々木　崇（atsasaki@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：4J04-08
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:30～ ミーティングルーム J

E3 ユビキチンリガーゼ RNF122 の骨格筋における発現制御機構及び機能解析

The analysis of the E3 ubiquitin ligase RNF122 expression mechanism and function in skeletal muscle

○栄田 陸人[1]、桑田 啓子[2]、柴田 貴広[3]、佐々木 崇[1]、高橋 裕[1]、山内 祥生[1]、佐藤 隆一郎[1]([1]東大院・農生科・応生化、[2]名大・ITbM、[3]名大院生命農)
○ Rikuto SAKAEDA[1], Keiko KUWATA[2], Takahiro SHIBATA[3], Takashi SASAKI[1], Yu TAKAHASHI[1], Yoshio YAMAUCHI[1], Ryuichiro SATO[1] ([1]Dept. of Appl. Biol. Chem., Grad. Sch. of Agr. and Life Sci., Univ. of Tokyo, [2]ITbM, Nagoya Univ., [3]Grad. Sch. of Bioagric. Sci. Nagoya Univ.)

加齢に伴い様々な疾病の罹患率が上昇し、低栄養状態を原因とした筋萎縮が生じやすくなる。筋萎縮は運動機能の低下や生活習慣病の発症を誘導することから、健康寿命の延伸を実現するために低栄養が骨格筋に及ぼす影響を分子レベルで解明することが求められている。

当研究室は絶食時の骨格筋で著しく発現が低下し、再摂食に伴い回復する E3 ユビキチンリガーゼとして RNF122（RING finger protein 122）を見出した。E3 ユビキチンリガーゼは基質タンパク質のユビキチン化を介して基質タンパク質を分解・活性化するなど生体に必須の機能を持つ酵素であり、その中でも特徴的な発現変動を示す RNF122 は栄養状態に応答した重要な機能を持つと考え研究を進めた。これまでにマウス骨格筋由来 C2C12 筋管細胞における糖代謝を阻害することで、*Rnf122* 発現が有意に低下することを明らかにした。また RNF122 の機能解析に向けて、3×Flag タグを融合させた RNF122 を過剰発現するアデノウイルスを作製した。これを感染させた C2C12 筋管細胞を用いて 3×Flag タグを利用した共免疫沈降を実施した結果、TBC1D15（TBC1 domain family member 15）が RNF122 の基質である可能性が見出された。

TBC1D15 を KO した細胞では GLUT4 発現が低下することが過去に報告されていることから、現在 C2C12 筋管細胞において RNF122 を過剰発現させた時の TBC1D15 や GLUT4 の発現変動について検証を進めており、当日は最新のデータを含めた発表を予定している。

E3 ubiquitin ligases play important roles in the regulation of protein function by degradation or controlling activity of their substrates via ubiquitination. We found the E3 ubiquitin ligase RNF122 (RING finger protein 122) was markedly downregulated in skeletal muscle during fasting and restored upon refeeding, and inhibition of glucose metabolism in C2C12 myotubes significantly reduced *Rnf122* expression. By co-immunoprecipitation experiments in C2C12 myotubes infected with the adenovirus overexpressing RNF122, TBC1D15 (TBC1 domain family member 15) was identified as a candidate substrate for RNF122.

As the previous report showed that TBC1D15 deficiency reduced GLUT4 expression, we are investigating whether RNF122 overexpression in C2C12 myotubes affects the TBC1D15 and GLUT4 protein level. The latest results will be introduced in this presentation.

skeletal muscle, E3 ubiquitin ligase, glucose metabolism

講演番号：4J04-09
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:30～ ミーティングルーム J

C3H マウスにおける脂質異常症の原因遺伝子の同定

Identification of causative gene for dyslipidemia in C3H mice

○小林 美里[1]、石井 玲佳[1]、神戸 芙美[1]、加藤 大和[1]、一柳 健司[1]、大野 民生[2]、宮坂 勇輝[2]、村井 篤嗣[1]、堀尾 文彦[1]([1]名古屋大院生命農、[2]名古屋大院医学系)
○Misato KOBAYASHI[1], Reika ISHII[1], Fumi KANBE[1], Hirokazu KATOH[1], Kenji ICHIYANAGI[1], Tamio OHNO[2], Yuki MIYASAKA[2], Atsushi MURAI[1], Fumihiko HORIO[1] ([1]Nagoya Univ., [2]Nagoya Univ. Graduate School of Med.)

【背景・目的】脂質異常症は、心疾患や脳血管疾患と深く関与する動脈硬化のリスクファクターである。我々は、高トリグリセリド(TG)血症および低 HDL コレステロール(HDL-C)血症を呈する C3H-S マウス（C3H/HeN の亜系統）を見出した。高 TG，低 HDL-C の原因遺伝子の存在領域を C3H-S と C57BL/6J との F2 交雑群での遺伝解析によって、マウス第２番染色体 155-173 Mb 領域内に絞りこんだ。本研究では、原因遺伝子の第 2 番染色体上の存在領域をさらに絞りこむことによって、この原因遺伝子を同定することを目的とした。
【方法・結果】C3H/HeN 亜系統の高 TG および低 HDL-C を示す C3H-S マウスと、正常血中脂質濃度を示す C3H-C マウスの全ゲノムシークエンスの解析を行い、SNPs を抽出した。この SNPs を遺伝子型解析に用いた結果、第 2 番染色体のリン脂質転送タンパク質遺伝子(PLTP，164.85 Mb)内の SNP が最も血中脂質濃度と強い相関を示した。PLTP 遺伝子近傍を C3H-S 型で持つマウスは高 TG，低 HDL-C を示し、C3H-C 型に比べて PLTP 遺伝子発現量および血中の PLTP 活性が低下していた。
【結論】C3H-S マウスにおける高 TG および低 HDL-C の原因遺伝子が PLTP 遺伝子であることを明らかにした。

Dyslipidemia is a risk factor for arteriosclerosis that is associated with cardiovascular disease and cerebrovascular disease. We found that C3H-S mouse, one of C3H/HeN substrains, exhibited serum high triglyceride (TG) and low HDL cholesterol (HDL-C). As a result of genetic analysis of (C3H-S x C57BL/6J)F2 intercross mice, the chromosomal region responsible for dyslipidemia of C3H-S was detected on chromosome 2 (155-173Mb). In this study, we performed whole-genome sequencing analysis on C3H-S mouse and C3H-C mouse, a control substrain with normal serum lipid concentration. Genotyping analysis using SNPs revealed that the C3H-S allele of PLTP gene was associated with dyslipidemia and low PLTP mRNA levels. These results revealed that the causative gene for high TG and low HDL-C was PLTP gene.

cholesterol, triglyceride, pltp

講演番号：4J04-10
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:30～ ミーティングルーム J

コリン欠乏メチオニン減量高脂肪食誘導 NASH モデルマウスにおいて炭水化物代謝およびメチオニン代謝は肝線維化に関連する

Relationships between carbohydrate- and methionine-metabolism and hepatic fibrogenesis in CDAHFD-induced NASH model mouse

○三浦 徳[1]、川手 啓吾[3]、増澤(尾崎) 依[2]、細野 崇[2,3]、関 泰一郎[1,2,3] ([1]日大・生資科・総合研究所 rch Institute、[2]日大・生資科・生命化、[3]日大院・生資科・応生科)
○Atsushi Miura[1], Keigo Kawate[3], Yori Ozaki-Masuzawa[2], Takashi Hosono[2,3], Taiichiro Seki[1,2,3] ([1]Nihon Univ. General ResearchInstitute, [2]Nihon Univ., [3]Nihon Univ. Grad. School)

【背景と目的】全世界的に非アルコール性脂肪性肝疾患/肝炎(NAFLD/NASH)の罹患者は増加しており、有病率は 25%とも試算されている。これまでに我々は、コリン欠乏メチオニン減量高脂肪食(CDAHFD)誘導 NASH モデルマウスを用いて、NASH 誘導早期に肝臓への著しい脂肪蓄積や炎症性細胞の浸潤が観察されることを報告してきた。一方、本モデルにおける肝線維化メカニズムは不明である。本研究では、網羅的解析手法によって肝線維化と関連する代謝系を明らかにすることを試みた。
【方法】雄性 C57BL/6J マウス(10 週齢)に CDAHFD を 12 週間給餌した。CDAHFD 給餌後 0, 4, 8, 12 週で肝臓と血液を回収した。遺伝子発現について RNA-seq、代謝物の変化について GC/MS および LC/MS を用いたメタボロミクスを用いて網羅的な解析を実施した。
【結果・結語】CDAHFD 給餌早期から肝臓においてアミノ酸や炭水化物の代謝に関わる経路が変動した。特に、ペントースリン酸経路の代謝物や遺伝子発現が増加した。またメチオニン代謝に関して、肝メチオニンの低下とは相反的にシステインや *S*-アデノシルメチオニンの増加および関連代謝酵素群の発現変動を見出した。以上のことから、本研究では CDAHFD 誘導 NASH モデルにおける肝線維化に炭水化物代謝やメチオニン代謝の異常が寄与する可能性を明らかにした。

Non-alcoholic fatty liver disease/steatohepatitis (NAFLD/NASH) is a major public health problem. We reported that the choline-deficient L-amino acid-defined high-fat diet (CDAHFD)-induced NASH model mouse shows lipid accumulation and macrophage infiltration in the liver at an early stage of the onset. In this study, we report the relationships between metabolic changes and fibrogenesis in the CDAHFD-NASH model mice. We analyzed the liver of CDAHFD-NASH model mouse by using RNA-seq and metabolomic analysis. As a result, abnormal carbohydrate metabolism was observed in the liver of CDAHFD-fed mouse. We also found impairment of the methionine cycle in the livers. Taken together, metabolic defects of carbohydrate and amino acid may contribute to hepatic fibrogenesis in the CDAHFD-NASH model.

Non-alcoholic fatty liver disease, Non-alcoholic steatohepatitis, Methionine metabolism

講演番号：4J04-11
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:30～ ミーティングルーム J

コレステロール生合成を抑制する Felinine 経路の機能解析

Study on the felinine pathway down-regulating cholesterol biosynthesis in cats

○土井 侃昂、三浦 舞音、上野山 怜子、宮崎 珠子、宮崎 雅雄（岩手大学農）
○naotaka DOI, manon MIURA, reiko UENOYAMA, tamako MIYAZAKI, masao MIYAZAKI (iwate univ.)

ネコ特異的なアミノ酸「Felinine」は、ネコに特有な尿臭の原因物質である 3-mercapto-3-methyl-1-butanol（MMB）の前駆体である。これまで、Felinine 排泄の役割はネコに近縁なネコ科動物の種や性の情報を持つマーキング物質であると考えられてきた。しかし、Felinine 生合成の代謝経路（Felinine 経路）がコレステロール生合成の原料を作るメバロン酸経路から分岐するように位置していることから、Felinine 経路には尿臭物質の生成の他に、コレステロール生合成を抑制する役割があると示唆された。ネコにおいて、メバロン酸経路が抑制された時、コレステロール生合成と Felinine 生合成がどのように変動するかはよく分かっていなかった。そこで本研究では、メバロン酸経路律速酵素である HMG-CoA reductase（HMGCR）の阻害剤であるスタチンをネコに投与した時、血中コレステロール、および尿中 Felinine、Felinine 前駆体排泄量がどのように変動するかを調べた。まずスタチン投与前後のネコ尿を朝夕に採取し、尿を薄層クロマトグラフィー（TLC）で展開してニンヒドリン染色で Felinine を検出しその増減を調べた。また Bligh&Dyer 法で尿中の全脂質を抽出しメバロン酸経路の最終産物であるジメチルアリル二リン酸の脱リン酸化物質 3-methyl-2-buten-1-ol（3M2B）とイソペンテニル二リン酸の脱リン酸化物質 3-methyl-3-buten-1-ol（3M3B）の尿中含量をガスクロマトグラフ質量分析計（GC/MS）で定量した。その結果、Felinine および 3M2B と 3M3B の尿中含量はスタチン投与後にそれぞれ減少することが分かった。一方、血中コレステロール値は、投与前後でのおおきな変化を示さなかった。以上の結果より、Felinine 経路は、メバロン酸経路が生成する化合物量に大きく依存していることが明らかになった。

Felinine is a precursor of a chemosignal, 3-mercapto-3-methyl-1-butanol (MMB), in domestic cats. Previous study found that the felinine pathway is a shunt of the mevalonate pathway, indicating that it contributes to not only the biosynthesis of MMB but also down-regulation of the cholesterol biosynthesis in cats. However, little is known about how an inhibition of the mevalonate pathway effects on cholesterol and felinine biosyntheses in cats. This study examined contents of plasma cholesterol and urinary felinine and felinine precursors in cats administrated statin, an inhibitor of the mevalonate pathway. Felinine and its precursors, but not plasma cholesterol, decreased in cats after statin administration. In conclusion, we found that the end-products of the mevalonate pathway are used for the felinine biosynthesis rather than the cholesterol biosynthesis in cats.

cat, cholesterol, urine

講演番号：4J04-12
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:30～ ミーティングルーム J

コレステロール輸送体 ABCA1 が担う新規生理的役割をメダカを用いて探索する

Exploration of the novel roles of cholesterol transporter ABCA1 using Japanese medaka.

○二股 良太[1]、木下 政人[2]、木岡 紀幸[1,3]、植田 和光[3] ([1]京大院農・応用生命、[2]京大院農・応用生物、[3]京大・iCeMS)
○RYOTA FUTAMATA[1], MASATO KINOSHITA[2], NORIYUKI KIOKA[1,3], KAZUMITSU UEDA[3] ([1]Div. of Appl. Life Sci., Grad. Sch. of Agri., Kyoto Univ., [2]Div. of Appl. Biosci., Grad. Sch. of Agri., Kyoto Univ., [3]iCeMS, Kyoto Univ.)

【背景・目的】

ATP-binding cassette A1 (ABCA1)は様々な組織に広く発現するコレステロール輸送体であり、善玉コレステロールとして知られる HDL の産生を介して動脈硬化などの心血管系疾患の予防に貢献している。しかし、近年になって ABCA1 が細胞の増殖や遊走など基盤的な細胞機能を制御していることが報告され、ABCA1 が種々の生命現象に関与している可能性が示唆されてきた。そこで本研究では、*Abca1* 遺伝子欠損動物を作製し、表現型を解析することで ABCA1 の未知の生理的役割を探索することを目指した。*Abca1* 遺伝子欠損マウスは系統によって異なる表現型が報告されているため、解析が困難である。小型魚類のメダカは哺乳類と同様に細胞膜脂質の主な成分としてコレステロールをもつことに加えて、脂質異常症のモデル動物としても研究されていることから、本研究ではメダカを用いて ABCA1 の生理的役割を探索する。

【方法・結果】

メダカには *Abca1* ホモログと予想される遺伝子が 3 つ存在する(*Abca1a, Abca1b, Abca1c*)。これらの組織レベルでの発現を RNA-seq により調べたところ、それぞれ異なる発現パターンを示した。また、各 *Abca1* ホモログの cDNA をクローニングし、ヒト胎児腎臓由来細胞 HEK293 細胞に発現させたところ、全長での発現が確認され、ABCA1A および ABCA1C は細胞膜へ局在することがわかった。さらに、これら 2 つのメダカ ABCA1 発現細胞では培地中の脂質受容体であるアポリポタンパク質への脂質排出がみられ、ヒト ABCA1 と同様の機能をもつことが示唆された。次に、CRISPR-Cas9 システムを用いて各 *Abca1* 遺伝子単独欠損個体を樹立したところ、*Abca1a* 欠損メス個体に産卵異常が観察され、ABCA1 と生殖の関連が示唆された。

ATP-binding cassette A1 (ABCA1) is a cholesterol transporter which is responsible for HDL generation and plays an important role in preventing atherosclerosis. Recently, ABCA1 was implicated in the fundamental cell functions such as proliferation and migration. In this study, we aimed to explore the unknown physiological roles of ABCA1 using a novel model animal Japanese medaka (*Orizias latipes*). We generated *Abca1*-deficient medaka using CRISPR-Cas9 system and it turned out that *Abca1*-deficient female medaka was infertile.

ABC protein, ABCA1, medaka

講演番号：4J04-13
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:30～ ミーティングルーム J

筋萎縮応答性線維芽細胞増殖因子 FGF13 の骨格筋細胞における機能解析

A functional analysis of FGF13 in skeletal muscle

○野口 惇、清水 誠、山内 祥生、佐藤 隆一郎（東大院・農生科・応生化）
○Makoto Noguchi, Makoto Shimizu, Yoshio Yamauchi, Ryuichiro Sato (Dept. of Appl. Biol. Chem., Grad. Sch. of Agr. and Life Sci., Univ. of Tokyo)

超高齢化社会に突入した我が国において、加齢に伴う筋力・筋量の低下(サルコペニア)は QOL の低下や医療・介護費の増大を招く深刻な問題である。サルコペニアの予防は健康寿命の延伸や医療・介護費の削減につながる。このことから、筋力・筋量の制御メカニズムの解明は我が国の重要な課題と言える。我々はこれまでに筋萎縮に応答する新規増殖因子として FGF13 を同定し、5 つのアイソフォーム（s, u, v, vy, vy/y）の中でマウス骨格筋での主要なアイソフォームは FGF13vy/y であることを明らかにした。本研究ではマウス骨格筋細胞モデルを用いた FGF13 の機能解析を行った。まず、マウス後脚から筋サテライト細胞（SC）を調製し、siRNA を用いた FGF13 のノックダウン実験を行った。筋管細胞マーカーである myosin heavy chain（MHC）の免疫染色及び画像定量の結果、FGF13 KD により筋芽細胞の融合（Fusion index）や筋管直径は有意に低下した。また、SC マーカーである Pax7 の mRNA 及びタンパク質発現の増加が確認された。次に、FGF13 VY/Y の細胞内局在を調べるため、C2C12 細胞へ FGF13 VY/Y 発現プラスミドを強制発現し蛍光免疫染色を行った。C2C12 筋芽細胞では FGF13 は細胞全体に広く認められたが、筋管細胞では多くが核に存在した。以上の結果から、FGF13 は骨格筋分化に伴い核へ移行し Pax7 を介して筋分化を制御する可能性が示唆された。

The prevention of sarcopenia, an age-related loss of muscle mass and strength, results in the extension of healthy life span. Therefore, understanding of the regulatory mechanism in muscle mass and strength is an important issue in Japan. We previously reported FGF13 as a novel growth factor increased in muscle atrophy. In this study, we examine a function of FGF13 in mouse primary satellite cells (SC) and C2C12 cells. FGF13 knockdown (KD) decreased fusion index and myotube diameter in FGF13 KD SC. A decline of Pax7, a marker for SC, following in differentiation delayed in FGF13 KD SC. We next examine a localization in C2C12 cells. FGF13 is localized in cytosol and nucleus equally in myoblasts while FGF13 is mainly localized in nuclei after muscle differentiation. These results suggest that FGF13 is involved in myocyte differentiation and function in nuclei.

FGF13, muscle atrophy, satellite cell

講演番号：4J04-14
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:30～ ミーティングルーム J

骨格筋萎縮における抗肥満ホルモン FGF21 の発現制御機構および機能解析

Regulation and function of the anti-obesity hormone FGF21 in skeletal muscle atrophy

○川邊 充希、清水 誠、三浦 雄也、橋詰 力、山内 祥生、佐藤 隆一郎（東大院・農生科・応生化）
○ Mitsuki Kawabe, Makoto Shimizu, Yuya Miura, Tsutomu Hashidume, Yoshio Yamauchi, Ryuichiro Sato (Dept. of Appl. Biol. Chem., Grad. Sch. of Agr. and Life Sci., Univ. of Tokyo)

骨格筋は運動機能の中枢や糖脂質代謝を担うため、骨格筋量と機能の維持が重要である。しかし、これらは加齢に伴い減少し、サルコペニアを引き起こすことが知られている。したがって、骨格筋萎縮の制御機構を解明し、予防や治療に寄与する生体内分子を見出すことは、超高齢化社会において重要な課題である。FGF21 (Fibroblast Growth factor 21) は主に肝臓で合成・分泌される抗肥満ホルモン分子である。我々はこれまでに、筋萎縮時に骨格筋 FGF21 の遺伝子発現が顕著に増加すること、その発現制御には TGFβ が関与することを見出している。本研究では、FGF21 の筋萎縮における発現制御機構および機能解析を行った。

我々は、培養骨格筋細胞 C2C12 に TGFβ を添加すると FGF21 の発現が亢進する結果を得ている。骨格筋における TGFβ シグナルの解析を行った結果、筋萎縮により TGFβ の mRNA 発現、およびその下流の転写因子である Smad3 リン酸化の増加が認められた。次に、HEK293T 細胞を用いてレポーターアッセイを行った結果、Smad3 による FGF21 プロモーター領域の活性化が示された。また、様々な欠質体を用いた検討の結果、2 ヶ所の応答領域が示唆された。次に *in vivo* エレクトロポレーション法により、骨格筋選択的に FGF21 を過剰発現させたマウスを用いて機能解析を行った。FGF21 の過剰発現により筋断面積の有意な減少が認められた。一方で、E3 Ubiquitin Ligase である Atrogin-1 や MuRF1 の顕著な発現変動は認められなかった。これらのことから、FGF21 はユビキチン・プロテアソーム系以外に作用し、骨格筋線維を制御する可能性が示唆された。

FGF21 (Fibroblast Growth factor 21) is an anti-obesity hormone molecule that is mainly secreted from the liver. We have previously found that FGF21 expression in skeletal muscle is significantly increased during muscle atrophy. In this study, we analyzed a regulatory mechanism and function of FGF21 in muscle atrophy.

We found that the addition of TGFβ to cultured skeletal muscle cells C2C12 enhanced expression of FGF21. Expression of TGFβ mRNA and phosphorylation of Smad3 were significantly increased by denervation inducing muscle atrophy. A reporter assay analysis using HEK293T cells showed FGF21 promoter activity is increased by Smad3. To investigate a role of FGF21 *in vivo*, we introduced FGF21 expression plasmid into skeletal muscle. We observed cross-sectional area of skeletal muscle was reduced by FGF21. Because expression of some E3 Ubiquitin Ligases such as Atrogin-1 and MuRF1 were not changed, FGF21 regulates muscle fiber through mechanisms other than Ubiquitin-Proteasome pathway.

Skeletal muscle, FGF21, muscle atrophy

講演番号：4J04-15
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:30～ ミーティングルーム J

骨格筋損傷における核内受容体 LXR の機能解析

A functional analysis of the nuclear receptor LXR on skeletal muscle damage

○高瀬 飛天[1]、清水 誠[1]、小野 敦子[1]、近澤 未歩[1,2]、山内 祥生[1]、佐藤 隆一郎[1] ([1]東大院・農生科・応生化、[2]名城大学・農学部・応用生物化学科・栄養・食品学研究室)
○ Hayataka TAKASE[1], Makoto SHIMIZU[1], Atsuko ONO[1], Miho CHIKAZAWA[1,2], Yoshio YAMAUCHI[1], Ryuichiro SATO[1] ([1]Dept. of Appl. Biol. Chem., Grad. Sch. of Agr. and Life Sci., Univ. of Tokyo, [2]Dept. of Appl. Biol. Chem., Fac. of Agr., Meijo Univ)

超高齢社会を迎えた我が国では、骨格筋の機能低下による要介護や寝たきりとなった高齢者の介護問題に直面している。怪我などによる筋損傷は運動機能を低下させ、高齢者では筋損傷に対する応答再生能力が低下していることが報告されている。これまで我々は骨格筋に対し、神経毒 Cardiotoxin を用いた実験から、筋損傷により核内受容体 LXR の標的遺伝子の発現が増加することを見出した。LXR は酸化ステロールをリガンドとし、肝臓や脂肪組織においてコレステロール代謝や糖代謝などを制御する。一方で、骨格筋における LXR の機能は不明な点が多い。本研究では筋損傷における LXR 活性化機構及び機能解析を行った。酸化ステロールは Ch25h などの酵素依存的経路、活性酸素種などによる非酵素的経路により産生される。骨格筋における遺伝子発現解析の結果、筋損傷により酸化ステロール合成酵素や ROS で活性化される転写因子 NRF2 の標的遺伝子の発現が増加することが示された。骨格筋の酸化ステロール画分を用いた質量分析器による解析の結果、筋損傷により複数の酸化ステロール量が変動することが示された。次に、マウス培養骨格筋細胞 C2C12 を用いて、LPS による筋損傷モデルでの LXR の機能解析を行った。LXR 合成リガンド T0901317 や GW3965 の添加により LPS による筋繊維直径の縮小が抑制された。この抑制効果は LXR のアンタゴニスト GSK2033 によりキャンセルされた。遺伝子発現解析の結果、LXR のリガンドによるタンパク分解酵素や炎症性サイトカインの発現変動は認められなかった。以上の結果から、骨格筋損傷により LXR が活性化され、タンパク分解や炎症以外の経路で筋繊維を保護する可能性が示唆された。

One of the most urgent issues in Japan is the problem of caring for elderly people who need nursing care or are bedridden due to functional impairment of skeletal muscle. We previously found that muscle damage increases expression of target genes of LXR. In this research, we studied a mechanism how muscle damage regulates LXR activity and a role of LXR on muscle damage. Oxysterols are synthesized by an enzymatic (Ch25h etc) or a non-enzymatic (ROS etc) pathway. Gene expression analysis revealed that muscle damage increases expression of genes related to both pathways. A mass spectral analysis revealed that some oxysterol levels are changed by muscle damage. Next, we examined an inhibitory effect of LXR using C2C12 myotubes. LXR agonists repressed a decrease of myofiber during inflammation. These results indicated that muscle damage activates LXR, and LXR protects myofiber during inflammation.

muscle damage, oxysterol, LXR

発表責任者：高瀬飛天（hayataka@g.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：4J04-16
質疑応答日時、会場：3 月 21 日 10:30～ ミーティングルーム J

伸張性収縮を模倣した骨格筋細胞の新たな運動モデルの構築

A novel method of in vitro eccentric contractions of skeletal muscle cells

○清水 誠、髙瀬 飛天、佐藤 弘樹、山内 祥生、佐藤 隆一郎（東大農）
○ MAKOTO SHIMIZU, HAYATAKA TAKASE, HIROKI SATO, YOSHIO YAMAUCHI, RYUICHIRO SATO (Univ. of Tokyo)

サルコペニアは加齢に伴う筋量・筋力の低下であり、高齢者の寝たきりや要介護状態に繋がる重大なリスクファクターである。このことから、サルコペニアを阻害する骨格筋量の制御機構の解明は重要な課題である。伸張性収縮は他の収縮様式と比較して効果的な筋肥大効果を有する。しかし伸張性収縮実験は個体レベルでの検討が必要であり、細胞実験のような詳細な検討が困難であった。本研究では、マウスの培養骨格筋細胞 C2C12 を用いて、電気刺激と伸展刺激を組み合わせた in vitro の伸張性収縮モデルの構築を行った。

細胞伸展に使用されるシリコンチャンバーは細胞接着性が低い。様々な細胞外マトリックスを検討した結果、我々はコラーゲンゲルをシリコンチャンバー内に調製し、ゲル上培養により C2C12 細胞を骨格筋細胞へ分化させることに成功した。伸張性収縮を模倣するため、骨格筋細胞の収縮実験で繁用されている単収縮（Twitch）ではなく強収縮（Tetanus）による電気収縮刺激（EPS）を採用し、伸展刺激（Stretch）と組み合わせることで、伸張性収縮（EPS + Stretch）の系を構築した。分化させた C2C12 に伸張性収縮刺激を与え、遺伝子発現解析を行った。その結果、個体レベルでの伸張性収縮運動と同様に、メカニカルストレスシグナルなどの遺伝子発現変動が認められた。過剰な伸張性収縮は筋障害を惹起することが知られている。ELISA による解析の結果、伸張性収縮では培地中の LDH やミオグロビンの有意な増加は認められず、適切な運動強度であることが示唆された。以上の結果から、本研究で構築した方法は、骨格筋の伸張性収縮を模倣した系であることが示された。

Sarcopenia, an age-related loss of muscle mass, is a serious risk factor for falls and fractures in older adults. Because many developed and developing countries have a high population of older adults, it is important to understand a mechanism of a regulation of skeletal muscle mass. Eccentric contractions, lengthening of activated muscle, is known to be effective on muscular hypertrophy. To elucidate a detailed mechanism of muscular hypertrophy, we report here a novel *in vitro* technique of eccentric contractions. Differentiated C2C12 myotubes were cultured on a silicon chamber with a collagen gel. To reproduce *in vivo* eccentric contractions, myotubes were stimulated by both electrical pulse stimulation and mechanical stretching. Gene expression analysis revealed that expression of several genes including mechanical stress signaling were induced by eccentric contractions. Because excessive eccentric contractions promote muscle injury, we analyzed marker proteins in culture medium. After eccentric contractions, no increase of releases of LDH and myoglobin, makers of myotube damage and apoptosis, were observed. These results show that this novel method is useful for a detailed study of eccentric contractions.

skeletal muscle, eccentric contraction, C2C12

シンポジウムプログラム

3月19日（金）15:00 ～ 17:30

2AS　骨格筋を多角的視点から考える

3月19日（金） 15:00～17:30
会　場：ミーティングルーム A
世話人：眞鍋 康子（都立大人間健康），亀井 康富（京都府大生命環境）
座　長：眞鍋 康子（都立大人間健康），亀井 康富（京都府大生命環境）

15:00　2AS-01　骨格筋の代謝能および筋量制御の分子機序と食品成分による調節
……○亀井 康富（京都府立大 生命環境）
15:25　2AS-02　サテライト細胞による骨格筋再生制御とその位置依存性……○小野 悠介（熊本大学発生医学研究所）
15:50　2AS-03　質量分析イメージングを用いた骨格筋研究……○井上 菜穂子（日大・生物資源）
16:15　2AS-04　食肉の筋線維タイプ組成と呈味性の関連性……○水野谷 航[1]，小宮 佑介[2]（[1]麻布大獣医，[2]北里大獣医）
16:40　2AS-05　骨格筋機能に影響する遺伝子多型とスポーツパフォーマンス
……○福 典之（順天堂大学大学院スポーツ健康科学研究科）
17:05　2AS-06　骨格筋培養細胞の収縮力評価法の開発とその応用……○眞鍋 康子（都立大人間健康）

2BS　微生物研究の新機軸としての相互作用研究

3月19日（金） 15:00～17:30
会　場：ミーティングルーム B
世話人：萩原 大祐（筑波大生命環境），竹下 典男（筑波大生命環境）
座　長：萩原 大祐（筑波大生命環境），竹下 典男（筑波大生命環境）

15:00　2BS-01　木材腐朽菌類の種間競争と材分解……○深澤 遊（東北大学）
15:25　2BS-02　生物間相互作用で働く化合物を利用した AM 菌培養系の開発
……○亀岡 啓[1]，筒井 一歩[2]，齋藤 勝晴[3]，菊池 裕介[4]，半田 佳宏[5]，江澤 辰広[4]，林 英雄[2]，川口 正代司[5]，秋山 康紀[2]
（[1]東北大生命，[2]大阪府大生命環境，[3]信州大農，[4]北大農，[5]基生研）
15:50　2BS-03　冬虫夏草と昆虫にみられる共生関係の進化……○松浦 優（琉大・熱生研）
16:15　2BS-04　放線菌と土壌細菌との相互作用……○浅水 俊平，尾仲 宏康（東大院農）
16:40　2BS-05　カビ菌糸の高速道路と細菌の通行料……○竹下 典男（筑波大MiCS）
17:05　2BS-06　相互作用を利用した糸状菌の二次代謝研究……○萩原 大祐（筑波大学・生命環境）

2CS　抗酸化研究の新展開

3月19日（金） 15:00～17:30
会　場：ミーティングルーム C
世話人：居原 秀（大阪府大理学），内田 浩二（東京大学農学）
座　長：居原 秀（大阪府大理学），内田 浩二（東京大学農学）

15:00　2CS-01　2- オキソーイミダゾールジペプチドの抗酸化活性……○居原 秀（大阪府大理）
15:30　2CS-02　抗酸化因子セレノプロテインPの機能と疾患－両刃の剣としての必須微量元素セレン
……○斎藤 芳郎（東北大薬）
16:00　2CS-03　抗酸化転写因子 Nrf2 活性化による加齢変性疾患の早期予防……○伊東 健（弘前大医）
16:30　2CS-04　活性硫黄分子によるシグナル伝達と代謝制御……○赤池 孝章（東北大医）
17:00　2CS-05　抗酸化剤機能のパラダイムシフト……○内田 浩二（東大農）

2DS　天然物を基盤とした化学スペース拡充

後　援：老化促進モデルマウス（SAM）学会
3月19日（金）　15:00～17:30
会　場：ミーティングルーム D
世話人：菊地 和也（阪大工），上田 実（東北大理），村田 道雄（阪大理）
座　長：菊地 和也（阪大工），上田 実（東北大理）

15:00　2DS-01　天然物が示す脂質膜におけるユニークな分子認識
……○村田 道雄[1]，梅川 雄一[1]，花島 慎弥[1]，土川 博史[2]（[1]阪大院理，[2]大分大学医）

15:25　2DS-02　天然物立体異性体を用いる植物ホルモン受容体標的選択性の化学チューニング
……○上田 実（東北大理）

15:50　2DS-03　深層学習を用いた巨大分子構造のケミカル潜在空間の構築　……○榊原 康文，落合 俊貴（慶應大理工）

16:15　2DS-04　二つの新規探索法による生物活性天然物の開拓：タンパク質ビーズ法と微生物―動物細胞共培養法
……○荒井 緑（慶應大理工）

16:40　2DS-05　三次元構造を持つリコポジウムアルカロイドの全合成：活性発現の構造要因の解明を目指して
……○塚野 千尋（京大院農）

17:05　2DS-06　デリバリーヘッド改変による骨細胞機能の in vivo イメージング
……○菊地 和也[1,2]，橋本 龍[1]，蓑島 維文[1,2]（[1]阪大工，[2]阪大免フロ）

2ES　消化・吸収・分布から捉える食事脂質の役割・魅力

3月19日（金）　15:00～17:30
会　場：ミーティングルーム E
世話人：仲川 清隆（東北大院農），後藤 直宏（東京海洋大院），石塚 敏（北海道大学院農）
座　長：仲川 清隆（東北大院農），後藤 直宏（東京海洋大院）

15:00　2ES-01　安定同位体を用いた脂質研究……○後藤 直宏（海洋大）

15:35　2ES-02　高脂肪食摂取による代謝変動と 12 α水酸化胆汁酸の分泌増大……○石塚 敏（北大農）

16:10　2ES-03　実生活レベルの過酸化脂質の消化・吸収……○仲川 清隆（東北大農）

16:45　2ES-04　調理工程における食用油脂の酸化について……○今義 潤（株式会社J-オイルミルズ）

2FS　国菌・麹菌の横断的研究の幕開け～黄・黒・白麹菌全ての理解を目指して～

協　賛：日本生物工学会スローフード共生発酵工学研究部会
3月19日（金）　15:00～17:30
会　場：ミーティングルーム F
世話人：樋口 裕次郎（九大院農），二神 泰基（鹿大農），水谷 治（琉大農）
座　長：樋口 裕次郎（九大院農），二神 泰基（鹿大農），水谷 治（琉大農）

15:00　はじめに……○樋口 裕次郎（九大院農）

15:05　2FS-01　黄麹菌における有用物質生産に関連する膜交通の分子機構……○樋口 裕次郎（九大院農）

15:25　2FS-02　黄麹菌における加水分解酵素遺伝子の発現制御機構……○田中 瑞己（静県大食栄）

15:50　2FS-03　黄麹菌による清酒醸造における糖化と糖転移……○徳岡 昌文（東農大応生）

16:15　2FS-04　黒麹菌の細胞壁α-グルカン、黄麹菌と何が同じで何が違う？
……○水谷 治[1,2]，上地 敬子[1]，渡嘉敷 直杏[2]（[1]琉大農，[2]鹿児島連大農）

16:40　2FS-05　黒麹菌による泡盛中の香気物質 1-オクテン -3- オールの生合成について……○渡邉 泰祐（日大生資科）

17:05　2FS-06　白麹菌のクエン酸高分泌生産に関わるトランスポーターの解析
……○二神 泰基[1]，門岡 千尋[2]，後藤 正利[3]，玉置 尚徳[1]（[1]鹿児島大農，[2]筑波大生環，[3]佐賀大農）

2GS　微生物の進化・適応の原動力となるプラスミドの接合伝達現象

後　援：公益財団法人大隅基礎科学創成財団
3 月 19 日（金）　15:00～17:30
会　場：ミーティングルーム G
世話人：新谷 政己（静大院・総合科技），水口 千穂（東大・生物工学セ）
座　長：新谷 政己（静大院・総合科技），水口 千穂（東大・生物工学セ）

15:00　2GS-01　プラスミドの宿主域とゲノム塩基組成……○鈴木 治夫（慶大・環境情報）

15:25　2GS-02　どのプラスミドが，どのようなときに，どこからどこに移るのだろうか ……○新谷 政己[1,2,3]
（[1]静大院・総合科技，[2]静大・グリーン研，[3]理研・BRC-JCM）

15:50　2GS-03　**IncP-1** 型広宿主域プラスミドの伝達を左右する受容菌側因子の探索から何が見えるのか
……○守口 和基，鈴木 克周，清川 一矢，Zoolkefli Fatin Iffah Rasyiqah Mohamad（広島大統合生命）

16:15　2GS-04　接合伝達の直後，細胞内では何が起きているのだろうか……○宮腰 昌利（筑波大医）

16:40　2GS-05　細菌は接合伝達で獲得したプラスミドにどのように「順応」するのか？
……○水口 千穂[1,2]，野尻 秀昭[1,2]（[1]東大・生物工学セ，[2]東大・微生物連携機構）

17:05　2GS-06　**ESKAPE** 病原細菌の薬剤耐性プラスミド……○鈴木 仁人（国立感染研）

2HS　農芸化学領域における次世代放射光施設利活用ポテンシャルと将来展望

後　援：東北大学・国際放射光イノベーション・スマート研究センター
3 月 19 日（金）　15:00～17:30
会　場：ミーティングルーム H
世話人：原田 昌彦（東北大農），日高 將文（東北大農）
座　長：原田 昌彦（東北大農），日高 將文（東北大農）

15:00　はじめに……○原田 昌彦（東北大農）

15:05　2HS-01　次世代放射光施設の概要……○高田 昌樹（光科学イノベーションセンター）

15:25　2HS-02　東北大学の取り組みと産学連携への活用……○村松 淳司（東北大多元研）

15:45　2HS-03　農芸化学における次世代放射光のポテンシャル……○原田 昌彦（東北大農）

16:00　2HS-04　食・農分野でのフィージビリティスタディの紹介……○日高 將文（東北大農）

16:15　2HS-05　放射光を利用した食品の品質評価事例について……○入江 謙太朗（日清製粉グループ本社）

16:38　2HS-06　土壌中の微量元素分析における放射光利用事例……○牧野 知之（東北大農）

17:01　2HS-07　巨大タンパク質会合体ヘモシアニンの構造解析……○田中 良和（東北大院生命）

17:24　おわりに……○日高 將文（東北大農）

2IS　揮発性物質がもたらす生体調節機能

3 月 19 日（金）　15:00～17:30
会　場：ミーティングルーム I
世話人：長田 和実（日大食品生命），細野 朗（日大食品生命）
座　長：長田 和実（日大食品生命），細野 朗（日大食品生命）

15:00　2IS-01　気相中匂い物質の定量と動物行動に関する研究……○長田 和実，細野 朗（日本大生物資源）

15:25　2IS-02　マウスにおける２つの嗅覚系を介した天敵臭ピラジン化合物刺激に対する恐怖反応の制御
……○宮園 貞治[1]，野口 智弘[1]，笹島 仁[1]，長田 和実[2]（[1]旭川医大，[2]日本大生物資源科学）

15:50　2IS-03　芳香族炭化水素受容体を介したインドールによる抗炎症作用
……○白川 仁[1]，Islam Jahidul[1]，Agista Afifah Zahra[1]，鈴木 玲[1]，大崎 雄介[1]，小関 卓也[2]，駒井 三千夫[1]
（[1]東北大・院農，[2]山形大・農）

16:15　2IS-04　腸内細菌から産生される揮発性尿毒素の臨床的意義
……○脇野 修[1]，内山 清貴[1]，吉藤 歩[2]，伊藤 裕[1]（[1]慶應義塾大学医学部，[2]東京済生会中央病院）

16:40　2IS-05　メイラード反応生成香気成分 **DMHF** の香気刺激によって誘発される生理作用
……○大畑 素子[1]，横山 壱成[2]，矢田 幸博[3]，有原 圭三[2]
（[1]日本大学生物資源科学部，[2]北里大学大学院獣医学系研究科，[3]筑波大学大学院グローバル教育院）

17:05　2IS-06　人における匂いの影響……○坂井 信之（東北大文）

3月20日（土）15:00 ～ 17:30

3AS　現場で使用可能な核酸検査実現のための技術開発

3月20日（土） 15:00～17:30
会　場：ミーティングルーム A
世話人：保川 清（京都大学），藤原 伸介（関西学院大学），兒島 憲二（姫路獨協大学）
座　長：保川 清（京都大学），藤原 伸介（関西学院大学），兒島 憲二（姫路獨協大学）

15:00　3AS-01　**DNA 増幅におけるヘリカーゼの添加効果**……○藤原 伸介（関西学院大理工）

15:23　3AS-02　**RPA 法に使用するリコンビナーゼと一本鎖 DNA 結合タンパク質の開発と反応条件の最適化**
……○兒島 憲二（京大院農）

15:46　3AS-03　**フェロセンでラベルされた DNA オリゴマーを用いた固相条件下でのプライマー伸長反応による複数の SNP の識別**
……Ortiz Mayreli[1]，Simonova Anna[2,3]，Skouridou Vasoula[4]，Hocek Michal[2,3]，Katakis Ioannis[1]，○Ciara K. O'Sullivan[1,3]
（[1]Departament d'Enginyeria Química, Universitat Rovira i Virgili, Avinguda Països Catalans 26, 43007 Tarragona, Spain，[2]Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Czech Academy of Sciences, Flemingovo nam.2, 16610 Prague 6, Czech Republic，[3]Department of Organic Chemistry, Faculty of Science, Charles University, Hlavova 8, 12843 Prague 2, Czech Republic，[4]Institució Catalana de Recerca i Estudis Avançats, Passeig Lluis Companys 23, 08010 Barcelona, Spain Institució Catalana de Recerca i Estudis Avançats）

16:10　3AS-04　**現場使用が可能で操作が容易な等温 RNA/DNA 増幅反応の電気化学センサー**
……○Biyani Manish[1]，保川 清[2]（[1]バイオシーズ株式会社，[2]京都大農）

16:33　3AS-05　**COVID-19 診断法の概説と課題**
……○柳原 格[1]，田村 嘉孝[1]，大場 雄一郎[1]，竹内 宗之[1]，位田 忍[1]，名倉 由起子[1]，鈴木 孝一朗[2]，藤原 伸介[3]，保川 清[4]
（[1]大阪府立病院機構，[2]一財阪大微生物病研究会，[3]関学理工，[4]京大農）

16:56　3AS-06　**酵素の改良と核酸増幅への応用**……○保川 清（京大院農）

3BS　農芸化学における分子から細胞・個体レベルまでの生命金属科学研究

共　催：文部科学省科研費新学術領域研究「『生命金属科学』分野の創成による生体内金属動態の統合的研究」
3月20日（土） 15:00～17:30
会　場：ミーティングルーム B
世話人：鈴木 道生（東大院農），青野重利（分子研），神戸大朋（京大院農）
座　長：鈴木 道生（東大院農），青野重利（分子研），神戸大朋（京大院農）

15:00　3BS-01　**大腸菌の増殖を促進する金属タンパク質 SodCII の活性化メカニズム**……○古川 良明（慶大理工）

15:25　3BS-02　**NiFe 型ヒドロゲナーゼの活性中心形成に必要な CO 生合成反応の分子機構**
……○青野 重利（自然科学研究機構）

15:50　3BS-03　**キチン分解とバイオミネラリゼーション形成制御の関係**
……○鈴木 道生，近都 浩之，朱 凌霄（東大院農）

16:15　3BS-04　**植物のホウ酸トランスセプター**……○高野 順平（大阪府大生命）

16:40　3BS-05　**メラニン生合成における亜鉛の役割**……○神戸 大朋（京大院生命）

17:05　3BS-06　**チロシナーゼにおける銅イオンの位置遷移**……○藤枝 伸宇（阪府大生命）

3CS　天然物の全合成：何を選び、何を考え、何を得たか

3 月 20 日（土） 15:00～17:30
会　場：ミーティングルーム C
世話人：占部 大介（富山県大工・生医工研セ），斉藤 竜男（東農大生命），榎本 賢（東北大院農）
座　長：占部 大介（富山県大工・生医工研セ），斉藤 竜男（東農大生命），榎本 賢（東北大院農）

15:00　はじめに……○占部 大介（富山県大工・生医工研セ）

15:05　3CS-01　生物活性ジヒドロ - β - アガロフラン天然物の合成研究：(-)-isocelorbicol の高立体選択的合成から展開する celafolin B-1, B-2, B-3 の全合成
……毛利 朋世[2]，高橋 祐介[2]，桑原 重文[2]，○小倉 由資[1,2]（[1]東大院農生科，[2]東北大農）

15:33　3CS-02　ポリフェノールの一種であるエラジタンニンの化学合成研究
……○若森 晋之介，松本 慎太郎，楠木 怜奈，村上 慧，山田 英俊（関西学院大理工）

16:01　3CS-03　挑戦しがいのある標的天然物：カプラザマシン類の全合成……○塚野 千尋（京大院農）

16:29　3CS-04　多様な立体・骨格を有する類縁体合成を指向した天然物合成戦略……○早川 一郎（日大院総合基）

16:57　3CS-05　ストロファスタン骨格を有する天然ステロイド化合物の合成研究
……○桑原 重文[1]，佐藤 俊太郎[1]，福田 裕紀[1]，小倉 由資[1]，權 垠相[2]（[1]東北大院農，[2]東北大院理）

17:25　おわりに……○榎本 賢（東北大院農）

3DS　プレシジョン栄養学が拓く未来の健康食品栄養学

3 月 20 日（土） 15:00～17:30
会　場：ミーティングルーム D
世話人：小田 裕昭（名大院生命農学），阿部 圭一（国立医薬・健康・栄養研究所）
座　長：小田 裕昭（名大院生命農学），阿部 圭一（国立医薬・健康・栄養研究所）

15:00　3DS-01　プレシジョン栄養学とは何か。データ駆動型栄養学と現状と取り組み……○小田 裕昭（名大生命農）

15:30　3DS-02　食の臨床試験の健康情報を活用した個別化栄養の取組み……○西平 順（北海道情報大医療情報）

16:00　3DS-03　腸内環境に基づくプレシジョン栄養学
……○福田 真嗣[1,2,3,4]（[1]慶大先端生命研，[2]神奈川産技総研，[3]筑波大医学医療系，[4]メタジェン）

16:30　3DS-04　あらゆる買い物をヘルスケアに～プレシジョン栄養学をめざした実践の試み～
……○小原 一樹，中村 寛子（シルタス 株式会社）

17:00　3DS-05　AI 栄養とプレシジョンヘルス＆ニュートリション……○阿部 圭一（医薬基盤・健康・栄養研究所）

3ES　タンパク質生産の実用化に向けた産学官の挑戦

後　援：一般財団法人バイオインダストリー協会・新資源生物変換研究会
3 月 20 日（土） 15:00～17:30
会　場：ミーティングルーム E
世話人：五味 勝也（東北大院農），尾崎 克也（JBA）
座　長：五味 勝也（東北大院農），尾崎 克也（JBA）

15:00　はじめに……○五味 勝也（東北大院農）

15:05　3ES-01　抗体の開発・生産に向けた効率的スクリーニング技術開発……○梅津 光央（東北大院工）

15:33　3ES-02　タンパク質生産性を向上させる遺伝子配列設計技術……○亀田 倫史（産総研人工知能）

16:01　3ES-03　*Trichoderma reesei* を用いたバイオマス糖化酵素の開発……○掛下 大視（花王株式会社）

16:29　3ES-04　「Corynex®」：*Corynebacterium glutamicum* によるバイオ医薬品生産
……○松田 吉彦，菊池 慶実（味の素株式会社 バイオ・ファイン研究所）

16:57　3ES-05　タンパク質源としてスピルリナを新たな農作物にする……○佐々木 俊弥（株式会社タベルモ）

17:25　おわりに……○阪井 康能（京大院農）

3FS　細菌が生産する細胞外膜小胞の生理機能と形成機構

3月20日（土）　15:00～17:30
会　場：ミーティングルームF
世話人：栗原 達夫（京大化研），渡部 邦彦（京都府大院生命環境），豊福 雅典（筑波大生命環境）
座　長：栗原 達夫（京大化研），渡部 邦彦（京都府大院生命環境），豊福 雅典（筑波大生命環境）

15:00　3FS-01　メンブレンベシクル形成機構の多様性と普遍性……○豊福 雅典（筑波大 生命環境）
15:25　3FS-02　細菌膜観察で見出された型破りな膜小胞形成……○田代 陽介[1,2]（[1]静大院総合科技，[2]JSTさきがけ）
15:50　3FS-03　発酵食品や腸管に関連する細菌の細胞外膜小胞の特性……○倉田 淳志（近畿大農）
16:15　3FS-04　細菌と宿主の細胞外小胞がもたらす炎症惹起のメカニズム
……○岡 真優子，今宮 理沙（京都府大院生命環境）
16:40　3FS-05　膜小胞応用のための量的コントロールおよび表面提示・改良に関する研究
……○渡部 邦彦（京都府大院生命環境）
17:05　3FS-06　膜小胞高生産性細菌 ***Shewanella vesiculosa*** **HM13** における細胞外膜小胞生産の分子基盤
……○栗原 達夫（京大化研）

3GS　食品タンパク質由来の健康機能性ペプチド研究の最先端

3月20日（土）　15:00～17:30
会　場：ミーティングルームG
世話人：長岡 利（岐阜大応生科），松井利郎（九大院農）
座　長：長岡 利（岐阜大応生科），松井利郎（九大院農）

15:00　3GS-01　脂質代謝改善ペプチド……○長岡 利（岐阜大学応用生物科学部）
15:30　3GS-02　消化管内分泌系への作用を介する糖代謝改善ペプチド……○比良 徹（北大院農）
16:00　3GS-03　食品ペプチドの修飾と機能……○佐藤 健司（京都大院農）
16:30　3GS-04　ペプチドの新規送達戦略と配列機能解析……○本多 裕之（名古屋大院工）
17:00　3GS-05　脳移行ペプチド……○松井 利郎（九大院農）

3HS　新しい微生物培養技術の有効性を考える

共　催：文部科学省科研費新学術領域研究「超地球生命体を解き明かすポストコッホ機能生態学」
後　援：筑波大学微生物サステイナビリティ研究センター，東京大学微生物科学イノベーション連携研究機構
3月20日（土）　15:00～17:30
会　場：ミーティングルームH
世話人：高谷 直樹（筑波大・生命環境系/MiCS），野尻 秀昭（東大・生物生産工学セ）
座　長：高谷 直樹（筑波大・生命環境系/MiCS），野尻 秀昭（東大・生物生産工学セ）

15:00　はじめに……○高谷 直樹（筑波大・生命環境系/MiCS）
15:05　3HS-01　超ハイスループットな微生物の単離を可能とするマイクロデバイス……○佐々 文洋（九州大学）
15:30　3HS-02　培養アプローチで迫る稀少微生物たちの実体
……○中井 亮佑[1]，草田 裕之[1]，玉木 秀幸[1,2,3]
（[1]産総研・生物プロセス，[2]筑波大・生命環境，[3]東京大・生セ）
15:55　3HS-03　分離培養手法の革新に向けて：さみしがり屋だけど人込みは嫌い……○青井 議輝（広島大統合生命）
16:20　休憩
16:25　3HS-04　**Water-in-oil** ドロップレットを用いたハイスループット微生物培養技術の開発と応用
……○野田 尚宏（産総研バイオメディカル）
16:50　3HS-05　ハイスループット電極微生物培養は電気細菌の普遍性を示せるか？……○岡本 章玄[1,2]（[1]物材研，[2]北大理）
17:15　おわりに……○野尻 秀昭（東大・生物生産工学セ）

3IS　細胞死から紐解く生命システム論

3 月 20 日（土） 15:00〜17:30
会　場：ミーティングルーム I
世話人：加藤 節（広島大院統合生命），中岡 秀憲（京大院生命）
座　長：加藤 節（広島大院統合生命），中岡 秀憲（京大院生命）

15:00　　はじめに……○加藤 節（広島大院統合生命）
15:05　3IS-01　単細胞生物にとって死とは何か？……○吉田 知史（早稲田大国際）
15:30　3IS-02　細胞内 ATP 濃度と細胞死の関係……○高稲 正勝（群馬大未来先端）
15:55　3IS-03　分裂酵母の細胞死過程イメージングのためのプラットフォーム……○中岡 秀憲（京大院生命）
16:20　3IS-04　栄養飢餓による微生物細胞の死……○加藤 節（広島大院統合生命）
16:45　3IS-05　突然死を抑制する仕組みが細胞老化をもたらす……○松浦 彰（千葉大理）
17:15　　総合討論……○中岡 秀憲（京大院生命）

3JS　メタボロミクスやってみたい人集まれ！ - 実践プロトコル詳しく解説します！

3 月 20 日（土） 15:00〜17:30
会　場：ミーティングルーム J
世話人：馬場 健史（九大生医研），松田 史生（阪大情報）
座　長：馬場 健史（九大生医研），松田 史生（阪大情報）

15:00　3JS-01　メタボロミクスを実施する上での重要ポイント……○馬場 健史（九大生医研）
15:25　3JS-02　試料調製，サンプリングのプロトコル……○平山 明由（慶大先端生命研）
15:50　3JS-03　親水性代謝物のワイドターゲットメタボローム分析のプロトコル……○和泉 自泰（九大生医研）
16:15　3JS-04　脂質メディエーター類の質量分析プロトコル……○北 芳博（東大医）
16:40　3JS-05　メタボロミクスのデータ解析のプロトコル……○津川 裕司[1,2]（[1]理研CSRS，[2]理研IMS）
17:05　3JS-06　メタボロミクスの将来計画……○松田 史生（阪大情報）

3月21日（日）15:00 ～ 17:30

4AS　天然物研究の現在と未来

協　賛：新学術研究（研究領域提案型）生物合成系の再設計による複雑骨格機能分子の革新的創成科学
3月21日（日）　15:00～17:30
会　場：ミーティングルーム A
世話人：渡辺 賢二（静県大薬），葛山 智久（東大院農）
座　長：渡辺 賢二（静県大薬），葛山 智久（東大院農）

15:00　4AS-01　複雑骨格を構築する生合成マシナリーの機能予知
……○葛山 智久[1,2]（[1]東大院・農生科，[2]東大・微生物連携機構）

15:20　4AS-02　分子シミュレーションによる酵素触媒機構の解析
……○寺田 透[1,2]，森脇 由隆[1,2]，山田 真行[3]，清水 謙多郎[1,2,3]
（[1]東大・院農・応生工，[2]東大・微生物連携機構，[3]東大・院情報理工・コンピュータ科学）

15:40　4AS-03　新規ペプチド環化酵素 PBP-type TE の機能解析……○脇本 敏幸（北大院薬）

16:00　4AS-04　シトクロム P450 を誤作動させる分子を用いる高難度酸化反応
……○荘司 長三[1,2]，愛場 雄一郎[1]，有安 真也[1]（[1]名大院理，[2]JST CREST）

16:20　4AS-05　生合成を拡張した化学－酵素ハイブリッドプロセスの開発を目指して……○大栗 博毅（東大院理）

16:40　パネルディスカッション　天然物研究の現在と未来
……葛山智久[1]，寺田透[1]，脇本敏幸[2]，荘司長三[3]，大栗博毅[4]，
内山真伸[5]，浅井禎吾[6]，勝山陽平[1]，淡川孝義[5]
（[1]東大院農，[2]北大院薬，[3]名大院理，[4]東大院理，[5]東大院薬，[6]東北大院薬）

4BS　微生物におけるアミノ酸研究の新展開　～代謝制御機構・生理機能の発見から産業利用まで～

3月21日（日）　15:00～17:30
会　場：ミーティングルーム B
世話人：高木 博史（奈良先端大バイオ），小高 敦史（月桂冠 総研）
座　長：高木 博史（奈良先端大バイオ），小高 敦史（月桂冠 総研），高谷 直樹（筑波大生命環境／MiCS），水沼 正樹（広島大院統合生命）

15:00　はじめに……○高木 博史（奈良先端大バイオ）

15:05　4BS-01　超好熱性アーキアにおけるリジン・アルギニンの生合成
……○西山 真[1,2]（[1]東大・生物工学セ，[2]東大・微生物連携機構）

15:28　4BS-02　アミノ酸の新たな利用の可能性～有用ピラジン化合物の生合成と代謝工学～
……○桝尾 俊介[1,2]，高谷 直樹[1,2]
（[1]筑波大学生命環境系，[2]筑波大学微生物サステイナビリティ研究センター）

15:47　4BS-03　アルギニンによる酵母のプロリン資化抑制機構……○西村 明，高木 博史（奈良先端大・バイオ）

16:06　4BS-04　酵母のメチオニン代謝産物によ寿命制御機構……○水沼 正樹（広島大・院統合生命）

16:25　4BS-05　清酒酵母の機能性成分高蓄積機構と醸造特性との関係性……○金井 宗良（酒総研）

16:44　4BS-06　アミノ酸高含有酵母による清酒・酒粕の高付加価値化……○小高 敦史（月桂冠株式会社）

17:03　4BS-07　「アミノ酸機能工学」による酵母の高機能開発とその産業応用……○高木 博史（奈良先端大バイオ）

17:25　おわりに……○高木 博史（奈良先端大バイオ）

4CS　新型コロナウイルスパンデミック下での食糧問題に農芸化学分野が果たす役割

共　催：日本学術会議農芸化学分科会
3月21日（日）　15:00～17:30
会　場：ミーティングルームC
世話人：熊谷 日登美（日大生資科），清水 誠（東大，東農大），裏出 令子（京大複合研）
座　長：清水 誠（東大，東農大），熊谷 仁（共女大家政），熊谷 日登美（日大生資科），裏出 令子（京大複合研）

15:00　はじめに……○熊谷 日登美（日大生資科）
15:05　挨拶……○清水 誠（東大，東農大）
15:15　4CS-01　新たな時代における食の健康への貢献……○山本 万里（農研機構食品研究部門）
15:40　4CS-02　Covid-19パンデミックが食品メーカーに及ぼした影響とその対応策、この環境下で農芸化学研究者に期待すること……○前鶴 俊哉（株式会社ニップン）
16:05　4CS-03　調味料生産分野での役割……○北倉 芳久（キッコーマン食品株式会社）
16:30　休憩
16:35　4CS-04　新型コロナ禍から食品企業が学ぶべきこと……○秦 洋二（月桂冠（株））
17:00　4CS-05　これからのフードシステムの課題と新型コロナ感染症……○新山 陽子（立命館大学）
17:25　おわりに……○裏出 令子（京大複合研）

4DS　細菌の低栄養環境に対する増殖を伴う適応機構

後　援：環境バイオテクノロジー学会
3月21日（日）　15:00～17:30
会　場：ミーティングルームD
世話人：永田 裕二（東北大生命科学研究科），堀 知行（産総研），吉田 信行（静岡大総合科学技術研究科）
座　長：永田 裕二（東北大生命科学研究科），堀 知行（産総研），吉田 信行（静岡大総合科学技術研究科），加藤純一（広島大院統合生命科学），金原和秀（静岡大院総合科学技術）

15:00　環境バイオテクノロジー学会会長挨拶……○加藤 純一（広島大院統合生命科学）
15:05　はじめに……○永田 裕二（東北大院生命科学）
15:10　4DS-01　超低栄養性細菌はどのようにして栄養を得ているのか？……○吉田 信行（静大院・総合科技）
15:35　4DS-02　従属栄養細菌の極貧栄養環境でのCO_2依存的な増殖現象……○永田 裕二（東北大生命科）
16:00　4DS-03　白亜紀の超貧栄養海底下堆積物から生きて発見された生命
……○諸野 祐樹[1]，伊藤 元雄[1]，星野 辰彦[1]，寺田 武志[2]，堀 知行[3]，池原 実[4]，D'Hondt Steven[5]，稲垣 史生[6]
（[1]海洋機構高知コア，[2]マリンワーク，[3]産総研環境創生，[4]高知大海洋コア，[5]ロードアイランド大，[6]海洋機構MarE[3]）
16:25　4DS-04　身近に生息する貧栄養細菌と衛生学的問題……○古畑 勝則（麻布大　生命・環境科学）
16:50　4DS-05　乾燥環境下で生残する食中毒細菌の挙動……○小関 成樹（北大農）
17:25　総合討論……○吉田 信行（静岡大院総合科学技術）

4ES　微生物電気化学の最前線～発電、防食、物質生産から医療まで～

3月21日（日）　15:00～17:30
会　場：ミーティングルームE
世話人：高妻 篤史（東京薬科大生命），石井 俊一（海洋研究開発機構），井上 謙吾（宮崎大農）
座　長：井上 謙吾（宮崎大農），石井 俊一（海洋研究開発機構）

15:00　4ES-01　電気を感じるバクテリア：電気化学活性細菌の電位応答機構とその応用
……○高妻 篤史，廣瀬 篤弥，渡邉 一哉（東薬大生命）
15:30　4ES-02　地下圏における電気微生物の探索と電気メタン発酵……○石井 俊一（海洋研究開発機構）
16:00　4ES-03　地域資源バイオマスを利用した微生物燃料電池……○井上 謙吾（宮崎大農）
16:30　4ES-04　微生物と固相間の電子授受が引き起こす金属腐食……○平野 伸一（電中研）
17:00　4ES-05　環境や人体に棲むブラック電気細菌……○岡本 章玄[1,2]（[1]物材研，[2]北大理）

4FS　酵母研究の産業利用への展開；いま「Non-conventional yeasts」が新しい

3 月 21 日（日）　15:00～17:30
会　場：ミーティングルーム F
世話人：北本 宏子（農研機構・農環研），森田 友岳（産総研・機能科学），高久 洋暁（新潟薬大・応生科）
座　長：北本 宏子（農研機構・農環研），森田 友岳（産総研・機能科学），高久 洋暁（新潟薬大・応生科）

15:00　4FS-01　「Non-conventional yeasts の世界」新産業酵母研究会の１０年を振り返って
……○高木 正道（新潟薬科大学）

15:25　4FS-02　担子菌酵母によるバイオ界面活性剤の生産と産業利用……○森田 友岳，雜賀 あずさ（産総研・機能科学）

15:50　4FS-03　きのこにおける品種識別技術の開発について……○原田 慎嗣（ホクト株式会社）

16:15　4FS-04　C1 酵母で拓くメタノールバイオエコノミー……○由里本 博也，阪井 康能（京大院農）

16:40　4FS-05　*Ogataea minuta* でのバイオものづくり……○千葉 靖典[1]，横尾 岳彦[1]，馬場 悟史[2]，野中 浩一[2]（[1]産総研・細胞分子，[2]第一三共・バイオ医薬研）

17:05　4FS-06　産業利用を目指した油脂酵母の油脂生産機構の解明とその応用
……○高久 洋暁[1]，油谷 幸代[2]，荒木 秀雄[3]，正木 和夫[4]，家藤 治幸[5]，長沼 孝文[6]，山崎 晴丈[1]，髙木 正道[1]（[1]新潟薬大・応生科，[2]産総研・CBBD-OIL，[3]不二製油グループ本社，[4]酒類総研，[5]愛媛大，[6]山梨大）

講演番号：2AS-01
講演日時、会場：3 月 19 日 15:00～ ミーティングルーム A

骨格筋の代謝能および筋量制御の分子機序と食品成分による調節

Gene regulation in skeletal muscle energy expenditure and atrophy: possible utility of functional foods

○亀井 康富（京都府立大 生命環境）
○Yasutomi Kamei (Kyoto Pref Univ)

超高齢社会を迎えている我が国において、骨格筋の代謝能および肥大・萎縮の分子機序を理解する事は、人々の健康の維持・増進を目指した筋萎縮・筋機能不全の予防法の開発のために重要である。

転写因子 FOXO1 は生体代謝の同化ホルモンであるインスリンシグナルに拮抗する。我々は、遺伝子改変マウスを用いて、FOXO1 が骨格筋萎縮を引き起こすことを示した。FOXO1 の転写活性の抑制する食品成分を探索し、筋萎縮予防におけるビタミン D の役割が示唆された。

転写共役因子 PGC1 は、骨格筋代謝に重要である。我々は、PGC1β が骨格筋のミトコンドリア増加とエネルギー代謝（脂肪酸β酸化）亢進を引き起こすことを見出し、肥満モデルマウスの体重低下を観察した。PGC1β を活性化する食品成分のスクリーニングでとして大豆イソフラボンを見出し、抗肥満作用が示唆された。一方で、FOXO1 により PGC1β の遺伝子発現が抑制され、筋萎縮時のエネルギー代謝の低下の機序の一端が明らかとなった。

本研究では、FOXO1 と PGC1 を骨格筋代謝の主要な調節因子と位置づけ、遺伝子改変マウスと培養細胞を用いた解析の取り組みについて紹介する。

The skeletal muscle plays important roles in exercise, energy expenditure and glucose/amino acid metabolism. The prevention or cure of atrophy/dysfunction is particularly important in aged societies, which seriously impairs human health and quality-of-life.

FOXO1 is a forkhead-type transcription factor that antagonizes insulin-mediated anabolic signals. We produced transgenic mice that overexpress FOXO1 and found that they exhibit muscle atrophy. Therefore, clarifying the molecular mechanisms of FOXO1 in the skeletal muscles can provide clues for developing methods to prevent muscle atrophy.

Transcriptional coactivators PGC1s are important for muscle metabolism. Transgenic mice overexpressing PGC1β are lean and exhibit increased energy expenditure and, therefore, appears to play roles in anti-metabolic diseases, including obesity.

Thus, we are investigating the detailed mechanisms of muscle metabolism in vivo and in vitro, with focus on FOXO1 and PGC1 as major regulators. We hope that the mechanisms underlying the prevention of atrophy and dysfunction of the skeletal muscle will thereby be clarified, coupled to an increased understanding of the utility of functional foods for the prevention and/or alleviation of these conditions.

atrophy, energy expenditure, gene expression

講演番号：2AS-02
講演日時、会場：3 月 19 日 15:25～ ミーティングルーム A

サテライト細胞による骨格筋再生制御とその位置依存性
Position memory in skeletal muscle regeneration

○小野 悠介（熊本大学発生医学研究所）
○Yusuke Ono (Kumamoto Univ.)

骨格筋量を維持することは，加齢性筋脆弱症（サルコペニア）のみならず肥満や 2 型糖尿病を予防・改善し，健康長寿社会を実現するためのカギとなる。骨格筋幹細胞であるサテライト細胞は筋線維と基底膜の間に位置しており，損傷からの再生，筋肥大において重要な役割を担う。サテライト細胞は通常，休止期の状態で存在しているが，損傷等の刺激が入ると速やかに活性化し，増殖を繰り返す。その後，ほとんどの細胞は筋分化へ運命づけられ，互いにあるいは既存の筋線維へ融合することで最終分化を遂げる。一方，幹細胞プールを維持するために，活性化したサテライト細胞の一部は自己複製により再び休止期の状態に戻る。このようなサテライト細胞の運命決定機構は厳密に制御されていると考えられているが，加齢や全身性の代謝異常等によりその機構は破綻し，その結果，サテライト細胞の数や機能は低下する。近年，我々はサテライト細胞の不均一性に着目しており，特にサテライト細胞の位置情報の記憶（ポジショナルメモリー）の視座から筋再生のメカニズム解明に取り組んでいる。本シンポジウムでは，サテライト細胞による筋再生の制御機構について我々の最新知見を紹介したい。

Resident muscle stem cells, called satellite cells, are located between the basal lamina and the plasmalemma of myofibers. Satellite cells provide myonuclei for muscle hypertrophy and regeneration in adult muscle. Normally, satellite cells are quiescent but become activated in response to stimulation including traumatic muscle injury. After activation, they enter the cell cycle and give rise to proliferative satellite-cell progeny, called myoblasts. Myoblasts then undergo myogenic differentiation and either fuse with existing myofibers or form new myofibers by producing myonuclei. On the other hand, a minority of the population return to a quiescent state to self-renew, maintaining the muscle stem-cell pool. Recently, we revealed that satellite cells retain their positional identities in different muscles (positional memory), based on embryonic origin. Satellite cells isolated from hindlimb muscles, which originate from somite, differ in their fate-determination dynamics during proliferation, differentiation, and self-renewal compared with those from head muscles that originate from the cranial mesoderm. The positional identities in the satellite cell population among muscles may be related to region-specific pathophysiological phenotypes of muscle diseases. In this symposium, we will describe our recent progress in the positional memory of satellite cells in the regulation of muscle mass and regeneration.

satellite cells, muscle stem cells, muscle regeneration

講演番号：2AS-03
講演日時、会場：3 月 19 日 15:50～ ミーティングルーム A

質量分析イメージングを用いた骨格筋研究

Mass spectrometry imaging for skeletal muscle study

○井上 菜穂子（日大・生物資源）
○Naoko Goto-Inoue (Nihon Univ.)

骨格筋は、糖の貯蔵率・利用率が生体内で最も高い器官である。そして骨格筋が担う「運動」が糖尿病などの生活習慣病を予防・改善することは広く認識されている。骨格筋の糖代謝機能には筋細胞内の脂質が重要な役割を担っていることが知られている。そして脂質には様々な特徴を持った分子が存在しており、同じ脂質にもインスリン感受性を低下させるものもあれば、逆に亢進させるものもあることが近年の報告より明らかになってきた。つまり、脂質の量だけではなく、質に着目した研究が重要である。

そこで、我々は組織切片上において脂質分子の局在可視化を行う質量分析イメージング法を用いた解析を行っている。これまでの研究により、各筋線維特異的なリン脂質マーカーの同定に成功し、速筋線維、遅筋線維が独自のリン脂質組成を担っていることを明らかにした。さらに、持久運動により肥大した筋線維や、高脂肪食負荷モデルにおいて萎縮した筋線維に特徴的な脂質動態についても明らかにすることに成功した。本シンポジウムでは、質量分析イメージングの骨格筋研究への応用について、最近の研究成果を中心に紹介する。

It is well known that lipids in skeletal muscle play a fundamental role as an energy source both in normal muscle metabolism and in disease states. Phospholipids are a major lipid species that consist of the molecular layer of the cell membrane. Skeletal muscles are heterogeneous in nature, and are composed of a mixture of muscle fibers that can be distinguished based on their different physiological and biochemical characteristics. To demonstrate their fiber-specific lipid distribution, here we utilize matrix-assisted laser desorption/ionization-MS imaging (MALDI-MSI), which is an MS-based imaging technique.

By use of MS imaging, we could visualize lipid dynamics due to the muscle hypertrophy by chronic exercise and muscle atrophy by high-fat diet. In this session, I would like to introduce recent our MS imaging data and future perspectives of MS imaging.

Mass spectrometry imaging, skeletal muscle, lipids

講演番号：2AS-04
講演日時、会場：3 月 19 日 16:15～ ミーティングルーム A

食肉の筋線維タイプ組成と呈味性の関連性

Relationship between skeletal muscle fiber type and meat taste

○水野谷 航[1]、小宮 佑介[2] ([1]麻布大獣医、[2]北里大獣医)
○Wataru Mizunoya[1], Yusuke Komiya[2] ([1]Azabu Univ., [2]Kitasato Univ.)

食肉は部位が異なれば食感や風味が異なると感じる事は多い。この違いは食肉に含まれる脂の量や質にも起因するが、食肉の赤身の部分でも食感や風味は異なる。赤身は主に筋線維で構成され、収縮特性および代謝特性の違いから、遅筋タイプと速筋タイプの筋線維に分類できる。筋線維タイプは運動能力に強く影響することが知られているが、我々は遅筋タイプで優勢な有酸素的代謝の主要経路である TCA 回路の代謝基質は、アミノ基が転移することでアミノ酸に変換されることから、重要な呈味性化合物である遊離アミノ酸レベルも筋線維タイプで変化すると考えた。黒毛和種去勢肥育牛 (26 ヵ月齢) の枝肉から 21 種類の骨格筋サンプルを採取し、遅筋タイプのミオシン重鎖 (MyHC) 1 と速筋タイプの MyHC2 を分離する SDS-PAGE に供した。またそこに含まれるアミノ酸量を測定した。本実験で用いたウシの 21 種類の筋サンプルは、それぞれ固有の MyHC 組成比を示し、MyHC1 の組成比は最小 6.9 ± 3.9% 、最大 83.3 ± 16.7%であった。遅筋タイプの MyHC1 組成比は総遊離アミノ酸量と強い正の相関を示した。次に呈味性への影響を味覚センサー解析で調べたところ、牛肉溶液のうま味とうま味こくに相当する応答性が、MyHC1 と有意な正の相関を示した。以上より遅筋タイプの多い食肉では、遊離アミノ酸に起因するうま味とうま味こくが強く感じられることが示唆された。

Free amino acids are important components of tastants and flavor-precursors in meat. To clarify the correlation between muscle fiber type and free amino acids, we determined the concentrations of various free amino acids and dipeptides in samples of different muscle tissues (n = 21), collected from 26-month-old Japanese Black steers. The proportions of the myosin heavy chain (MyHC) slow (MyHC1) and fast (MyHC2) isoforms were determined by SDS-PAGE. The MyHC1 proportion ranged from 6.9 ± 3.9% to 83.3 ± 16.7%. We confirmed that there was a strong positive correlation between MyHC1 composition and total free amino acid concentrations. Furthermore, we found significant positive correlations of MyHC1 composition with umami taste, and with richness in beef samples using a taste sensor (INSENT SA402B). These result suggest that high levels of slow MyHC1 in beef (meat) can induce strong umami taste and richness induced by possibly high level of free amino acids contributing to the intense flavor of meat that is rich in slow-twitch fibers..

skeletal muscle, fiber type, taste

講演番号：2AS-05
講演日時、会場：3 月 19 日 16:40～ ミーティングルーム A

骨格筋機能に影響する遺伝子多型とスポーツパフォーマンス

Muscle function-related genetic polymorphisms and sports performance

○福 典之 (順天堂大学大学院スポーツ健康科学研究科)
○Noriyuki Fuku (Juntendo University)

アスリートの卓越した運動能力に遺伝要因が関わっているのは周知の事実である。特に骨格筋の特性は運動能力に大きく関わる。我々は、スポーツパフォーマンスや骨格筋機能に関連する遺伝子多型について候補遺伝子アプローチならびにゲノムワイド関連解析を用いて解析している。これまで報告されている多数の遺伝子多型の中でアンジオテンシン変換酵素遺伝子(ACE)の I/D 多型やαアクチニン 3 遺伝子(ACTN3)内にある C/T 多型(R577X)が運動能力に顕著に影響することが分かっており、その後の研究で筋線維組成にも影響していることを報告した。最近の研究では、速筋線維が高くなるような遺伝型を有すると高血圧発症頻度が高いこと、遅筋線維が高くなるような遺伝型を有すると長寿になりやすいことも分かってきている。また、ミトコンドリア DNA (mtDNA)の解析から、mtDNA 多型のセットであるハプログループが運動能力に関連することも分かってきた。興味深いことに、mtDNA にコードされ核遺伝コードで翻訳される MOTS-c が発見され、これがマイトカインとして働く可能性が示唆されている。本シンポジウムでは、骨格筋機能に関連する遺伝子多型と運動能力や生活習慣病との関連を演者らの研究成果を中心に紹介したい。

Twin studies evaluated that physical performance-related phenotypes were predicted to be significantly affected by genetic components. In 1998, an I/D polymorphism in the ACE gene was reported to influence human physical performance and we currently reported that this was also associated with muscle fiber composition. To date, numerous studies have used a candidate gene approach to identify genetic polymorphisms related to physical performance. However, only two genetic polymorphisms-ACE I/D and alpha-actinin-3 (ACTN3) R577X-have been extensively studied and are strongly associated with physical performance. It has been reported that mitochondrial DNA (mtDNA) polymorphisms are also associated with physical performance and some of them have link to lifestyle-related diseases. Recently, a unique peptide called MOTS-c, which may be one of mitokines, was discovered. A polymorphism, specific to Asians, that causes K14Q amino acid replacement was associated with muscle fiber composition as well as type 2 diabetes. In this symposium, we summarize associations of muscle function-related genetic polymorphisms with sports performance.

sports performance, lifestyle-related disease, genetic factors

講演番号：2AS-06
講演日時、会場：3 月 19 日 17:05～ ミーティングルーム A

骨格筋培養細胞の収縮力評価法の開発とその応用

Development of evaluation for myotubes contractility and its application

○眞鍋 康子（都立大人間健康）
○Yasuko Manabe (Tokyo Metropolitan Univ.)

加齢による筋量の減少や質の低下は、単に身体機能の低下を引き起こすだけではなく、様々な疾病に罹患するリスクを上昇させる。そのため、その予防策と治療に効果を発揮する薬剤や効果的な食品成分の探索が注目されている。しかし、加齢による筋萎縮を予防、あるいは治療するための薬剤や食品成分の開発は困難を伴う。その理由として、筋質の指標の 1 つとなる「筋の収縮力」を、筋細胞を用いて簡便に測定する方法がなく、標的とするものが実際に筋の質を改善するかの評価の判断が難しいからである。

我々のグループでは、初代培養筋細胞を用いて、筋細胞の収縮力を簡便に評価する系の構築を試みた。この系ではカバーガラス上に塗布した、硬さの異なる 2 層のシリコーン(基板)上に筋細胞を培養し、電気刺激を与えて細胞が収縮する際に発揮する収縮力を、基板の表面に生じるシワの量（force index）で評価する。この系を用いて、筋萎縮させた細胞の収縮力を測定すると force index が低下し、一方、筋肥大させた細胞では force index が増加することが明らかとなり、in vitro で細胞の収縮力を評価することが可能になった。本シンポジウムでは、この系を用いた応用の可能性も紹介する。

Muscle atrophy with aging not only lowers physical activity but also increases the risk of various diseases. Therefore, the prevention of muscle atrophy and the maintenance of muscle mass is receiving increased attention. Skeletal muscle cells (myotubes) are frequently used in basic research. On the other hand, finding new drugs and/or functional food components to prevent or treat muscle atrophy is difficult, because there are no suitable models to measure ″muscle contractility″, which is one of the indicators of muscle quality, using muscle cells. We recently developed the measurement system of myotube contraction force. In this system, myotubes are cultured on a two-layer silicone substrate of different hardness. When the myotubes are stimulated by an electric pulse, the muscle contraction force is visualized as wrinkles. The length of wrinkles is correlated with the magnitude of force, therefore analyzing the wrinkles can be used as an indicator of force. This system will contribute to the development of new substances to prevent or treat muscle atrophy.

skeletal muscle, contraction, muscle atrophy

講演番号：2BS-01
講演日時、会場：3 月 19 日 15:00～ ミーティングルーム B

木材腐朽菌類の種間競争と材分解

How does fungal competition affect wood decomposition?

○深澤 遊（東北大学）
○Yu Fukasawa (Tohoku Univ.)

野外で菌類の定着を受けて腐朽しつつある枯死木の内部では、多種の菌類がコロニー拡大をかけて空間獲得競争を繰り広げている。大きな倒木では、１本あたり数百種の菌類が検出されることも珍しくない。菌類の種間・種内での競争は、木材の分解にどのように影響するだろうか？菌類のコロニー同士が出会うと、二次代謝物質や酵素の生産が活性化される。これらは、相手のコロニーの生長を化学的に抑制したり、自分のコロニーを防御するためと考えられている。こういった競争にかかるコストが木材分解に与える影響は、相反する２通りの可能性が考えられる。一つは、限られた炭素資源を競争に割かれ、分解に投資できなくなるために分解が阻害される可能性。もう一つは、競争にかかった炭素を補填するために分解を活性化させる可能性である。培養実験からは、どちらの証拠も得られており、今後は影響の方向性を左右する要因の解明が望まれる。近年、この議論にヒントを与える重要な論文が発表された。それによれば、競争に関わっている菌類の競争力が強いと、菌類の炭素利用効率が低下するが、競争力が弱いと炭素利用効率は増加する、というものである。ただし、この研究は寒天培地上で麦芽エキスを炭素源として行われたものであり、今後は分解への影響について木材を基質として検証していく必要がある。

Intra- and interspecific competition is the dominant interaction in wood decay fungal communities. It is quite common that hundreds of fungal species are detected from single log. Addressing the effects of fungal competition on wood decomposition is crucial to predict global carbon cycle under the climate change, because climatic condition alters outcome of fungal competition. When fungal colonies of different species or individuals met, they activate production of secondary metabolites and enzymes, which thought to be used to inhibit antagonist's growth and protect their own colonies. Therefore, competition must be energetically expensive for fungal mycelium. There are two contradictory scenarios how such energetic cost affect decomposition. First, energetic cost for competition reduces energy allocation of fungi to decay enzyme production and thus retard decomposition. Second, fungi may activate decomposition to get more carbon to compensate carbon cost for competition. Laboratory incubation studies indicate both scenarios may evident. Therefore, factors influencing the direction of the effect should be explored in the future.

Wood decomposition, Fungal competition, Energetic cost

講演番号：2BS-02
講演日時、会場：3 月 19 日 15:25～ ミーティングルーム B

生物間相互作用で働く化合物を利用した AM 菌培養系の開発

Development of AM fungus culture system with compounds working in interspecific interactions

○亀岡 啓[1]、筒井 一歩[2]、齋藤 勝晴[3]、菊池 裕介[4]、半田 佳宏[5]、江澤 辰広[4]、林 英雄[2]、川口 正代司[5]、秋山 康紀[2] ([1]東北大生命、[2]大阪府大生命環境、[3]信州大農、[4]北大農、[5]基生研)
○ Hiromu Kameoka[1], Ippo Tsutsui[2], Katsuharu Saito[3], Yusuke Kikuchi[4], Yoshihiro Handa[5], Tatsuhiro Ezawa[4], Hideo Hayashi[2], Masayoshi Kawaguchi[5], Kohki Akiyama[2] ([1]Tohoku Univ., [2]Osaka Pref. Univ., [3]Shinshu Univ., [4]Hokkaido Univ., [5]NIBB)

アーバスキュラー菌根菌(Arbuscular mycorrhizal fungi: AM 菌)は数億年前に植物と共生を開始し、現在では陸上植物の約 80%と共生する。そのため、植物の生理・生態・進化を考える上で不可欠な存在である。また、AM 菌は植物から脂質や糖などの炭素源をもらう代わりに、植物にリンや窒素などの無機栄養を供給することから、生物肥料として農業への応用も期待されている。しかし、AM 菌は植物と共生しないと胞子を形成しないため、単独で培養することができない。この性質が基礎研究においても農業利用においても大きな障害となっていた。

我々は、AM 菌胞子から単離されたバクテリアが AM 菌胞子形成を誘導するという報告を基に研究を開始し、AM 菌胞子形成誘導物質としてバクテリア由来の分枝鎖脂肪酸を単離した。さらに、パルミトレイン酸やミリスチン酸がより強力に胞子形成を誘導することを見出し、これらの脂肪酸を用いて AM 菌単独培養系の確立に成功した。

ただし、現状では培養効率が低いことが問題となっている。そこで、現在は AM 菌と植物との相互作用に注目して培養系の改善を目指している。その取り組みについても紹介したい。

Arbuscular mycorrhizal (AM) fungi are the important factors to reveal the physiology, ecology, and evolution of land plants, because AM symbiosis originated more than 450 million years ago and are conserved among 80% of land plants. In addition, as AM fungi provide plants with mineral nutrients, they are used as biofertilizers. Their obligate biotrophy, however, strongly disturbs the basic research and agricultural use of AM fungi.

We focused on the report that AM fungi induced spore formation in co-culture with the bacteria isolated from AM fungi and identified a branched-chain fatty acid as a stimulant of spore formation in AM fungi. Moreover, we found that palmitoleic acid and myristic acid strongly induce spore formation and established the axenic culture system of AM fungi by using these fatty acids.

This culture system, however, is low efficient. Then, we are trying to improve this culture system focusing on the interaction between AM fungi and plants.

arbuscular mycorrhizal fungi, plant-microbe interaction

講演番号：2BS-03
講演日時、会場：3 月 19 日 15:50～ ミーティングルーム B

冬虫夏草と昆虫にみられる共生関係の進化

When a parasite turns into a beneficial symbiont: endosymbiosis between cicadas and Ophiocordyceps fungi

○松浦 優（琉大・熱生研）
○Yu Matsuura (TBRC, Univ. Ryukyus)

寄生や相利共生などの生物間の共生は，環境，個体の生理・遺伝的な要素，相互作用の「綱引き」により関係性がダイナミックに変化する．これまで演者は昆虫と微生物の間でみられる絶対共生関係の進化的起源の解明に取り組んできた．本講演ではセミ類と共生微生物の奇異な共生関係の進化について紹介する．セミ類の多くは 2 種の栄養共生細菌と絶対的な共生関係にあることが知られていたが，演者らの研究により片方の共生細菌が異常なゲノム進化を遂げたのちに失われ，代わりに冬虫夏草のセミタケ類（*Ophiocordyceps* 属）に由来する共生菌が存在することが判明した．冬虫夏草は主に昆虫などを殺して繁殖する寄生性の子のう菌類の総称であり，一般的に昆虫の天敵と考えられているが，驚くべきことにこれらの寄生菌は繰り返し共生菌へと進化したと考えられる．そこで，なぜセミタケ類が共生菌に進化しやすいのか，そしてどのような遺伝的変化によって寄生菌が病原性を失ったのか解明するため，共生菌および近縁な寄生性セミタケのゲノム，またそれらの生殖機構に焦点を当てて現在研究を進めている．なお，これらの共生菌や寄生菌を含む日本の冬虫夏草の多くの種の系統学的位置や詳しい生態はほとんどわかっていないことから，本格的な基礎・応用研究を進めるためにまず冬虫夏草の野外調査，分類学的研究をより積極的に推進することが重要であることにも触れたい．

The borderline between mutualism and parasitism of host-microbe interactions is obscure and seems context-dependent on physiological, genomic, and evolutionary states of both entities. Many microbial symbionts have become beneficial in diverse insects providing essential nutrients, hypothetically evolved from commensal or parasitic microbes. After decades of research, we now have a broader view on which groups of microbes are beneficially associated with insects. However, little is known for how and why certain microbes evolved into obligate symbionts. Here, I present such an evolutionary transition in cicadas. *Hodgkinia cicadicola* is an obligate bacterial symbiont of cicadas, whose genomes are degenerated and facing extinction. Many species of cicadas have lost *Hodgkinia* but instead recruited *Ophiocordyceps* symbionts, derived from cicada-specific fungal entomopathogens. The symbionts were acquired independently at multiple occasions across the host taxa, but the evolutionary transition from parasitic ancestors into beneficial symbionts is still unclear. How exactly does the fungus compensate for the role of extinct *Hodgkinia*? What genomic changes made deadly parasites into beneficial symbionts? How do these parasites and symbiont sexually reproduce, or not? In order to answer these unexplored questions, I will outline my current project focusing on *Ophiocordyceps* fungi in Japan.

symbiosis, parasitism, insect

講演番号：2BS-04
講演日時、会場：3 月 19 日 16:15～ ミーティングルーム B

放線菌と土壌細菌との相互作用
Interaction between actinomycetes and other soil bacteria

○浅水 俊平、尾仲 宏康（東大院農）
○Shumpei Asamizu, Hiroyasu Onaka (The Univ. of Tokyo)

Streptomyces coelicolor activates the production of red-colored antibiotic undecylprodigiosin (RED) in response to the stimulation through physical contact of mycolic acid-containing bacteria *Tsukamurella pulmonis* TP-B0596 during “combined-culture”. To elucidate the molecular mechanism of the metabolic responses by actinomycetes, random mutant library generated by $^{12}C^{5+}$ heavy-ion beam irradiation was used to screen for the mutants which were altered in RED productivity, and the mutational points in the mutants were identified by genome re-sequencing. In this presentation, I will first talk about TetR family transcription factor (*sco1718*) which was found to be responsible for delayed RED production in the mutant. In brief, it is proposed that SCO1718 represses the expression of an adjacent ABC transporter that pumps out yet-to-be-defined small molecule(s) which accumulation is considered to lead to RED production during combined-culture.

In the next, I will talk about the natural compound that induced bump structure in *Streptomyces* cells. During the analysis of interaction between *Streptomyces variegatus* HEK138A (*Sv*) and mycolic acid-containing bacteria *Mycobacterium septicum* HEK138M (*Ms*) which were co-isolated from the Hegura island soil, we incidentally found that the bump structure was formed in *Sv* mycelium by additional co-culture of *Bacillus subtilis* (*Bs*). The substance that induced the bump structure in *Sv* was identified as pyrogallol in the co-culture extracts of the three strains, using bioactivity-guided isolation. Pyrogallol killed *Sv* but also induced bump structure on *Sv* mycelium in sublethal concentration. The production of pyrogallol was observed only in the combination of *Ms* and *Bs*, when co-culture combinations were examined. In summary, our results revealed that pyrogallol was produced by a bacterial interaction of *Ms* and *Bs*, and consequently induced the bump structure in *Sv*. The observed phenomena may be an exemplified interaction of complex bacterial community in the natural environment.

Streptomyces, co-culture, mycolic acid-containing bacteria

講演番号：2BS-05
講演日時、会場：3 月 19 日 16:40～ ミーティングルーム B

カビ菌糸の高速道路と細菌の通行料

Fungal highway and bacterial toll

○竹下 典男（筑波大 MiCS）
○Norio Takeshita (Tsukuba Univ. MiCS)

細菌と糸状菌はいずれも、自然界に広く存在する主要な微生物で、互いに作用して、それぞれの特徴的な機能を発揮していることが明らかとなってきています。本研究では、細菌と糸状菌のモデル生物である *Bacillus subtilis* (枯草菌)と *Aspergillus nidulans* を共培養し、これらの相互作用を解析しました。その結果、寒天培地上で、細菌が自身の鞭毛を使って糸状菌の菌糸上を秒速 30 マイクロメートルという速度で素早く移動する様子が観察されました。また、糸状菌の菌糸ネットワークの生長を利用して細菌がその生存空間を拡大している様子を、タイムラプス撮影により可視化しました。細菌は、菌糸を高速道路のように利用して、より速くより遠くへ移動することができます。一方、菌糸の先端まで移動した細菌から、糸状菌にビタミン B1(チアミン)が供給され、菌糸の生長を促進していることが分かりました。すなわち、細菌は菌糸の「高速道路」を移動し、糸状菌は「通行料」としてチアミンを受け取り、互いにメリットを得ています。このことは、空間的相互作用と代謝的相互作用の組み合わせにより、細菌と糸状菌が共同体として生存空間を拡大するという、これまで知られていなかった相利共生の仕組みを示しています。細菌と糸状菌の相互作用を理解することは、これら微生物が関わるバイオマス分解、動物植物への感染、植物共生と植物生育促進、発酵食品の生産などの制御につながると考えられます。

Physical spaces and nutrients are prerequisites to the survival of organisms while few interspecies mutual strategies are documented that satisfies them. Here we discovered a mutualistic mechanism between filamentous fungus and bacterium, *Aspergillus nidulans* and *Bacillus subtilis*. The bacterial cells co-cultured with the fungus traveled along mycelia depending on their flagella and dispersed farther with the expansion of fungal colony, indicating that the fungal mycelia supply space for bacteria to migrate, disperse and proliferate. Transcriptomic, genetic, molecular mass and imaging analyses demonstrated that the bacteria reach the mycelial edge and supply thiamine to the growing hyphae, resulting in a promotion of hyphal growth. The thiamine transfer from bacteria to the thiamine non-auxotrophic fungus is directly demonstrated by stable isotope labeling. The simultaneous spatial and metabolic interactions demonstrated in this study, reveal a mutualism that facilitates the communicating fungal and bacterial species to obtain environmental niche and nutrient respectively.

Abeysinghe G, *et al.* Life Sci Alliance. 2020, 3(12):e202000878.

fungi, bacteria, symbiosis

講演番号：2BS-06
講演日時、会場：3 月 19 日 17:05～ ミーティングルーム B

相互作用を利用した糸状菌の二次代謝研究

Fungal secondary metabolism boosted by microbial interaction

○萩原 大祐 (筑波大学・生命環境)
○Daisuke Hagiwara (Univ. of Tsukuba)

糸状菌は多様な化合物を産生する能力を有し、天然化合物の探索源として重要な菌群である。糸状菌のゲノムには、多数の化合物生合成遺伝子が存在しているが、その多くは実験室の培養では発現しない。そのため、生態により近い環境に菌を置くことにより、これらの休眠生合成遺伝子を活性化させる試みが広がっており、近年は特に生物間相互作用に注目が集まっている。我々のグループにおいても、相互作用を利用した糸状菌二次代謝の活性化に着目し、広範囲な探索や活性化分子機構の解明を目指しており、基礎のみならず応用も見据えた研究を進めている。本講演では「糸状菌間の相互作用」と「糸状菌とマイコウイルスの相互作用」がもたらす二次代謝の活性化について紹介する。

糸状菌間の相互作用では、*Aspergillus* 属菌をモデルとした混合培養系を構築し検討したところ、接触を必要とする物理的作用と、培養液中に分泌されるシグナルを介した化学的作用による化合物代謝の活性化を見出した。また、ウイルスによる作用では、植物病原菌イネいもち病菌に感染するマイコウイルスが、カビ毒テヌアゾン酸の産生促進に関わることを発見した。マイコウイルスを利用した糸状菌二次代謝の活性化という、これまでにない視点を提供する。以上の研究から、微生物間の相互作用と化合物産生の繋がりを生態的な観点から考察し、相互作用を利用することで広がる二次代謝研究の展望を共有したい。

Filamentous fungi are able to produce various compounds. However, most of the biosynthetic genes are not expressed under laboratory conditions. To activate these silent genes, attentions have been focused on ecological conditions, particularly on the microbial interaction. We are also focusing on the activation of secondary metabolism of filamentous fungi using microbial interaction, aiming at a wide range of exploration and elucidation of the activation molecular mechanism. In this talk, we will introduce the activation of secondary metabolism brought by ″fungal-fungal interaction″ and ″virus-fungal interaction″. From these findings, we will discuss the relationship between the microbial interactions and compound production from an ecological point of view, and share the prospect of secondary metabolism research that can be expanded by using the microbial interactions.

Secondary metabolism, Microbial interaction, Mycovirus

講演番号：2CS-01
講演日時、会場：3 月 19 日 15:00～ ミーティングルーム C

2-オキソーイミダゾールジペプチドの抗酸化活性

Antioxidant activity of 2-oxo-imidazole dipeptide

○居原 秀（大阪府大理）
○Hideshi Ihara (Osaka Pref. Univ.)

カルノシンやアンセリンなどのイミダゾールジペプチド（Imidazole-dipeptides ; IDPs）は、骨格筋や脳に多く存在し、抗酸化活性を示すと考えられている。しかし IDPs の *in vitro* における抗酸化活性は、グルタチオンやアスコルビン酸と比べはるかに低く、IDPs の抗酸化メカニズムに関しては、不明な点が多く残っていた。我々は、高速液体クロマトグラフィータンデム型質量分析装置を用いて、マウス筋肉抽出液中に含まれるカルノシン、アンセリンおよび関連ペプチドを網羅的に解析し、IDPs の酸化修飾物である 2-オキソ-イミダゾールジペプチド（2-oxo-IDPs）を検出した。2-oxo-IDPs は、脳、肺、心臓、腎臓、肝臓、筋肉で pmole/mg タンパク質のオーダーで検出され、また、敗血症関連脳症モデルマウスの脳内において、過酸化脂質の増加に先立ち 2-oxo-IDPs の増加が認められた。さらに、カルノシン合成酵素恒常発現細胞では、過酸化水素による毒性が有意に減少し、この時、細胞内 2-oxo-IDPs は増加した。以上の結果から、IDPs は酸化ストレスを軽減し、2-oxo-IDPs は酸化ストレスに依存して増加することが明らかとなった。さらに、DPPH アッセイで 2-oxo-カルノシンの抗酸化活性を評価したところ、カルノシンより 1 万倍以上も抗酸化活性が高いことが明らかとなった。本講演では、2-oxo-IDPs の抗酸化能について、最近の知見も含めて紹介したい。

Imidazole-containing dipeptides (IDPs), such as carnosine and anserine, are found exclusively in various animal tissues, especially in their skeletal muscles and nerves. They show an antioxidant activity through their metal-chelating and free radical-scavenging properties. However, the underlying mechanisms that could fully explain the antioxidant effects of the IDPs remain obscure. We have comprehensively analyzed carnosine and its related small peptides in the soluble fraction of a mouse muscle homogenate and detected 2-oxo-histidine-containing dipeptides (2-oxo-IDPs) in the mouse tissue homogenates. Enhanced production of the 2-oxo-IDPs was seen in the brain of a mouse model of sepsis-associated encephalopathy. In SH-SY5Y human neuroblastoma cells stably expressing carnosine synthase, H_2O_2 exposure resulted in the intracellular production of 2-oxo-carnosine, which was associated with significant inhibition of the H_2O_2 cytotoxicity. Notably, 2-oxo-carnosine showed a better antioxidant activity than carnosine. Thus, the present study revealed 2-oxo-IDPs as metal-catalyzed oxidation products present *in vivo* and provides a novel paradigm to understand the antioxidant effects of the IDPs.

Antioxidant activity, 2-oxo-imidazole dipeptide, imidazole dipeptide

講演番号：2CS-02
講演日時、会場：3 月 19 日 15:30～ ミーティングルーム C

抗酸化因子セレノプロテインＰの機能と疾患－両刃の剣としての必須微量元素セレン

Biological Function of Selenoprotein P and its Related Diseases- Selenium, an Essential Trace Element as a Double-edged Sword

○斎藤 芳郎（東北大薬）
○Yoshiro Saito (Tohoku Univ.)

必須微量元素セレンを含む血漿タンパク質セレノプロテインＰ（SeP）は、主に肝臓で合成され血中に分泌される。SeP は、分子内に 10 原子のセレンをセレノシステイン（Sec：システインの硫黄がセレンに置き換わったアミノ酸）の形で持つ。SeP は、各組織にセレンを運搬する機能を持ち、C 末端側に存在する 9 残基の Sec がセレン運搬作用を担う。SeP により供給されたセレンは、活性酸素種の除去およびレドックス制御に重要な細胞内セレン含有酵素の合成に用いられる。さらに、SeP は過酸化リン脂質を還元無毒化する酵素活性を持ち、N 末端側の Sec が活性部位として機能する。以上、SeP は、自身の抗酸化作用およびセレン供給を介した細胞内抗酸化システムの維持により、生体の酸化ストレス防御に重要な役割を担っていると考えられる。

セレンと環境汚染物質である水銀との強固な相互作用はよく知られているが、我々は最近、SeP がメチル水銀と特異的に結合し、メチル水銀の生体内分布・毒性緩和に深く関わっていることを見いだした。一方近年、2 型糖尿病患者において SeP が増加し、増加した SeP（過剰 SeP）が骨格筋や肝臓のインスリン抵抗性、および膵臓のインスリン分泌を障害し、糖代謝を悪化する“悪玉”として作用することが明らかとなってきた。本シンポジウムでは、SeP の抗酸化作用、特に最近明らかになってきたメチル水銀との相互作用とその意義について解説する。さらに、過剰 SeP による糖代謝悪化機構、ならびに肝臓における SeP の発現制御機構について最近の知見について紹介し、生体の抗酸化システムと疾患との関連性について議論する。

Selenoprotein P (SeP; encoded by *SELENOP*) contains the essential trace element selenium (Se) in the form of selenocysteine (Sec), which is an analog of cysteine that contains Se instead of sulfur. SeP functions as a Se-transporter to maintain antioxidative selenoenzymes in several tissues and plays a pivotal role in Se-metabolism and antioxidative defense; however, recent studies indicate that excess SeP exacerbates glucose metabolism and promotes type 2 diabetes. This presentation focuses on the biological functions of SeP, particularly its role in antioxidative defense. Furthermore, the effects of excess SeP on glucose metabolism, and resulting diseases are discussed.

Selenoprotein, methylmercury, Diabetes

講演番号：2CS-03
講演日時、会場：3 月 19 日 16:00～ ミーティングルーム C

Prevention of age-related degenerative disease by Nrf2-based early intervention

○Ken Itoh (Hirosaki Univ.)

According to Strehler's four rules, aging is an *intrinsic*, *progressive*, and naturally irreversible process that *universally* affects all individuals, and is *deleterious* for them. Harman’s free radical theory of aging proposed that oxidative stress due to the overproduction of mitochondrial reactive oxygen species (ROS) induces aging. Thus, many investigators have tested the effect of antioxidants such as Vitamin C and vitamin E on age-related diseases such as cardiovascular diseases, but mostly in vain. In contrast to the direct antioxidants such as Vitamin C and vitamin E, indirect antioxidant such as sulforaphane rich in broccoli sprout activates the transcription factor Nrf2 that in turn regulates a myriad of antioxidant genes including i) genes involved in GSH synthesis such as cystine transporter xCT and γ–glutamyl cysteine synthetase (γGCS), and thioredoxin, ii) genes involved in NADPH synthesis such as malic enzyme and glucose-6 dehydrogenase, iii) genes involved in the detoxification of ROS such as glutathione peroxidases and peroxiredoxins, etc. via antioxidant responsive element (ARE). Accordingly, Nrf2 activation reportedly protects against various age-related diseases.

Recent investigations have clarified the importance of mitochondria in various age-related degenerative diseases including late onset Alzheimer’s disease. Mitochondrial functional disturbance is often observed preceding the actual appearance of pathophysiological alterations and contributes to the pathogenesis. The signals from damaged mitochondria are transferred to the nucleus leading to the altered expressions of nuclear-coded genes that includes mitochondrial proteins (i.e. retrograde signaling). Recent observations increasingly show the importance of bZIP transcription factor ATF4 in the mitochondrial retrograde signaling to recover the redox homeostasis of mitochondria. We previously identified ATF4 as an Nrf2 binding protein through yeast two-hybrid screening and showed that ATF4 and Nrf2 cooperatively regulate the inducible expression of antioxidant genes such as xCT and catalytic and modulatory subunit of γGCS. As it is reported that Nrf2 inhibits the ATF4-regulated proapoptotic CHOP gene expression, Nrf2 activation may enhance the antioxidant effect with ATF4, while inhibiting the proapoptotic effect of ATF4 target genes during aging.

Considering cost-effective prevention strategy against age-related diseases, employment of phytochemicals that activate Nrf2 is a feasible approach. Using the newly developed Alzheimer’s model mice, we showed that the feeding the mice with fortified broccoli sprout extract improved the memory of mice. Further elucidation of Nrf2-centered transcription factor network may be useful in the development of a novel neuroprotective strategy.

Aging, oxidative stress, Nrf2

講演番号：2CS-04
講演日時、会場：3 月 19 日 16:30～ ミーティングルーム C

活性硫黄分子によるシグナル伝達と代謝制御

Supersulfide signal regulation and metabolism

○赤池 孝章（東北大医）
○Takaaki Akaike (Tohoku Univ.)

近年、システインパースルフィド（CysSSH）をはじめとする活性硫黄分子種が生体内で大量に合成され、強力な抗酸化活性やレドックスシグナル制御機能を発揮していることが明らかとなった（Ida, T., et al., ***PNAS***, 2014）。さらに我々は、タンパク質翻訳酵素の一つであるシステイン tRNA 合成酵素（cysteinyl-tRNA synthetase, CARS）が、新しい CysSSH 生成酵素（cysteine persulfide synthase, CPERS）であることを証明した（Akaike, T., et al., ***Nat. Commun.***, 2017）。すなわち、CARS/CPERS は、翻訳時に、システインから CysSSH を合成し、これを tRNA に取込むことで、タンパク質をパースルフィド化している（protein persulfidation）。真核細胞においては、細胞質に存在する CARS1 とミトコンドリアに局在する CARS2 があり、CARS1/CPERS1 がつくる CysSSH は 翻訳時にタンパク質に取り込まれる。また、CARS2/CPERS2 由来の硫黄代謝物は、ミトコンドリアの電子伝達系において、プロトン・電子を授受し膜電位を形成することで、硫黄依存型エネルギー代謝である硫黄呼吸を司る。一方、CARS2/CPERS2 変異マウスを作成して CysSSH の生理機能を解析したところ、活性硫黄分子種が、その抗炎症作用とともに、T 細胞分化を強く抑制することで顕著な免疫制御機能を発揮していることが分かった。さらに最近、CARS/CPERS から供給されるパースルフィドが、タンパク質チオール基に硫黄分子を補填することで、タンパク質のチオール基を保護したり、タンパク質の可塑性や品質を管理維持することも明らかになった（***Sci. Adv.***, Dóka, E., Akaike, T., et al. 2020, 2021）。すなわち、活性硫黄分子はタンパク質ポリスルフィド化を介して、レドックスシグナル、酸化ストレスや ER ストレス応答を制御している。本セッションでは、これまでの生命科学研究において全く未知の領域であった新規硫黄代謝経路の発見と、それを契機に急速に進展しつつある超硫黄生物学の世界の大きな潮流について紹介する。

Reactive sulfur species, Supersulfide biology, Signal and metabolism

講演番号：2CS-05
講演日時、会場：3 月 19 日 17:00～ ミーティングルーム C

抗酸化剤機能のパラダイムシフト

Paradigm shift of antioxidant functions

○内田 浩二（東大農）
○Koji Uchida (Univ. Tokyo)

植物は、ビタミンやミネラルなどの供給源であることは言うまでもなく、老化や疾病に対して予防効果のある様々な生体調節機能成分を含むなど、機能性成分の宝庫である。中でも、アスコルビン酸（ビタミン C）やポリフェノールなどの抗酸化剤は、活性酸素やフリーラジカル種に鋭敏であり、自身の酸化を介して抗酸化性を示すものと理解されている。一方、これらの抗酸化剤は、一旦酸化されると生体成分に対して化学反応性を示すようになる。これに関連したアミノ基との反応では、ポリフェノールの酸化型は、アミンオキシダーゼ様活性というユニークな潜在能力をもつ。興味深いことに、こうした脱アミノ化反応後に生成される修飾タンパク質が、IgM 抗体の新たなリガンドとしての機能を持つことが明らかになってきた。さらに、抗酸化剤修飾タンパク質は IgM 産生を亢進すること、B 細胞への結合能を獲得すること、免疫細胞の Ca^{2+}シグナルを誘導することなど、自然免疫応答活性化因子であることが明らかになっている。また最近では、抗酸化剤修飾タンパク質がヒストン結合活性を示すことが明らかになっている。こうした一連の研究から、抗酸化剤が持つ新たな機能の解明が進みつつあり、これらが抗酸化剤の本質的機能であることを予感させる。

Phytochemicals, non-nutritive plant chemicals in fruits and vegetables, are believed to play a role in their beneficial effects on human health. Polyphenols are the most diverse group of phytochemicals and have attracted significant attention as potential chemopreventive agents against chronic diseases. They are considered as antioxidants in general; however, their roles in health and in disease still remain unclear. One important aspect of antioxidants is that they are very sensitive to oxidants and are easily converted to their oxidized forms. The antioxidants once oxidized are transformed to powerful electrophiles that can readily react with proteins, especially primary amino group of lysine residues. We have recently shown that the antioxidants, such as DHA and EGCG, converted proteins into oxidation-specific epitopes that could activate innate immune responses. In addition, our recent study identified histone as a target of the epitopes and proposed a mechanism by which the epitopes exert their anti-inflammatory function via binding to histone. These findings offer an attractive hypothesis that phytochemicals and their metabolites possessing a similar oxidative deamination activity could be an important trigger of innate immune response, thereby contributing to the protection against exogenous pathogens and damage-associated molecules.

Antioxidants, Oxidation-specific epitopes, Anti-inflammation

講演番号：2DS-01
講演日時、会場：3 月 19 日 15:00～ ミーティングルーム D

天然物が示す脂質膜におけるユニークな分子認識

Natural products and membrane lipids interplay responsible for biological activities

○村田 道雄[1]、梅川 雄一[1]、花島 慎弥[1]、土川 博史[2] ([1]阪大院理、[2]大分大学医)
○Murata Michio[1], Yuichi Umigawa[1], Shinya Hanashima[1], Hiroshi Tsuchikawa[2] ([1]Osaka Univ., [2]Oita Univ.)

天然物は、特異な化学構造と生物活性によって合成化合物群とは異なる化学スペースを占めることが知られている。作用標的タンパク質への結合を通じて薬理作用を発現する際に、化学スペースを拡充することの重要性が認識されており、その点でも天然物の輝きは衰えていない。

われわれは、タンパク質への結合ではなく、天然物が細胞膜に結合した時の挙動に注目して研究を行ってきたが、天然物ならではの特徴と思える特徴を発見している。例えば、サポニンは様々な薬効によって古くから利用されてきたが、一方で強い溶血作用などが問題となることもある。また、アンフォテリシンＢに代表されるポリエンマクロライド抗生物質はタンパク質を介さずに生体膜にイオン透過性チャネルを形成することによって選択毒性を発現する。サポニンが細胞内の標的に結合するためには脂質二重膜を通過する必要があり、また、抗生物質が薬理作用を示すためには生体膜に含まれるステロールとともに複合体を形成する必要がある。これら長年人々の健康を支えてきた膜作用性の化合物に焦点を当て、天然物ならではの作用機構についてわれわれが得てきた知見を紹介したい。

Natural products are known to occupy a different chemical space than synthetic compounds due to their unique chemical structure. The importance of expanding the chemical space has been recognized, and in that respect, the brilliance of natural products has not diminished.

We have revealed some of the unique features of natural products in model membranes. For example, saponins have been used for a long time due to various medicinal properties. Polyene macrolide antibiotics exhibit selective toxicity by forming ion-permeable channels on biological membranes. Focusing on these membrane-acting compounds that have supported human health for many years, We would like to disucss recent findings we have gained about the mechanism of membrane action unique to natural products.

saponin, antibiotics

講演番号：2DS-02
講演日時、会場：3 月 19 日 15:25～ ミーティングルーム D

天然物立体異性体を用いる植物ホルモン受容体標的選択性の化学チューニング

stereochemical isomer of natural product enables chemical tuning of subtype-selectivity of plant hormone receptor

○上田 実（東北大理）
○Minoru Ueda (Tohoku Univ.)

近年、植物ホルモン受容体の化学遺伝学的研究が盛んである. その基盤技術となっているのは、ユニークな化合物ライブラリからのランダムスクリーニングによる受容体アンタゴニスト、アゴニスト探索である. しかし一方で、ランダムスクリーニングには欠点も多く、これを補完するため、論理的分子設計による受容体アンタゴニスト、アゴニスト開発が検討されている. 我々は、天然物をベースとすることで、オフターゲット効果の少ない効果的な受容体アゴニストの開発に成功した. しかし、天然物をベースとした誘導体合成でカバーできるケミカルスペースは限られており、天然物の特長を生かしつつ、広範なケミカルスペースをカバーできるスクリーニング指針の開発の必要性を痛感してきた. 最近我々は、天然物の立体異性体を網羅的に合成し、立体異性体ライブラリを用いる受容体アゴニスト開発に成功した. 今回の講演では、その詳細について述べると共に、天然物のもつ特徴を上手く活かすことで、これまでにないリガンドスクリーニングを実現できることを報告する.

In recent years, chemical genetic studies of plant hormone receptors have attracted attentions. The key technology is receptor antagonist and agonist discovery by random screening by a unique chemical library. Although random screening has serious drawbacks, the rational design of receptor antagonists/agonists is being explored to complement it. We have succeeded in developing powerful receptor agonists based on natural products without off-target effects. However, the chemical space that can be covered by natural product-based derivative is limited, and the need to develop screening guidelines that can cover a wide chemical space while taking advantage of the characteristics of natural products has been keenly desired.
We have recently established a comprehensive chemical library of natural product stereoisomers and successfully developed a receptor agonist by using it. In this presentation, I would like to discuss the details on how the unique characteristics of natural products can be used in the screening.

jasmonate, receptor, natural products

講演番号：2DS-03
講演日時、会場：3 月 19 日 15:50～ ミーティングルーム D

深層学習を用いた巨大分子構造のケミカル潜在空間の構築

Construction of chemical latent space for macromolecular structures using deep learning

○榊原 康文、落合 俊貴（慶應大理工）
○Yasubumi Sakakibara, Toshiki Ochiai (Keio Univ.)

本研究の目的は，天然化合物のような巨大で多様な分子構造をもつ化合物群で構成されるケミカルスペースから射影される潜在空間（latent space）を，人工知能分野における深層学習を適用して構築することである．深層学習手法により化合物ライブラリーの分子構造群を潜在空間に射影する第一の目的は，ケミカルスペースの多様性を数理的な空間で表現をすることにある．これにより，化合物の構造や機能の分布を情報学的に解析することが可能となり，また視覚的に確認をすることができる．第二の目的は，獲得した潜在空間をもとに，目的の機能に最適化された新規の化合物構造を設計することにある．例えば，潜在空間における抗がん剤分子標的薬の分布が判明すれば，その周辺空間から新たに化合物を生成することで分子標的薬としてより最適化された化合物構造を設計することができる．このような目的のために，人工知能の分野において，化合物の自己符号化器（JT-VAE）が提案されてきたが，どの手法も低分子化合物を対象としていたため，天然化合物のような巨大分子構造を扱うことができなかった．本研究では，天然化合物を扱うための自己符号化器（NP-VAE）を新たに開発し，巨大分子構造を射影した潜在空間を獲得することに成功した．NP-VAE は，深層学習手法の Tree-LSTM や VAE を駆使し，部分構造抽出と学習アルゴリズムを改良することにより開発を達成した．その精度は，従来の深層学習手法よりも高かった．本手法を用いて，世界で初めての天然物・巨大分子構造の潜在空間を構築した．

The purpose of this research is to construct a latent space mapped from a chemical space composed of a library of compounds with huge and diverse molecular structures such as natural compounds by applying deep learning in the field of artificial intelligence. The main purpose of mapping the molecular structures of the compound library into the latent space is to express the diversity of the chemical space. The second purpose is to design a new compound structure optimized for the desired function based on the acquired latent space. Since all previous methods such as JT-VAE targeted low-molecular-weight compounds, they could not handle macromolecular structures like natural compounds. In this study, we have newly developed a variational auto-encoder (NP-VAE) for handling natural compounds and succeeded in acquiring a latent space that maps macromolecular structures. Using this method, we constructed the novel latent space for natural products and macromolecular structures.

Chemical space, Latent space, Deep learning

講演番号：2DS-04
講演日時、会場：3 月 19 日 16:15～ ミーティングルーム D

二つの新規探索法による生物活性天然物の開拓 ：タンパク質ビーズ法と微生物―動物細胞共培養法

Search for bioactive natural products by original methods: Fishing by protein-beads and microorganism-animal cells co-incubation

○荒井 緑（慶應大理工）
○Midori ARAI (Keio Univ.)

生物活性な天然物を，タンパク質をえさにして釣り上げる．そのような探索法,「標的タンパク質指向型天然物単離法」を我々は開発してきた．天然物の混合物である植物や放線菌の抽出エキスには，人知の及ばない構造や生物活性を有する化合物が含まれている．我々はタンパク質（転写因子）ビーズを用いる探索法で神経幹細胞のニューロンへの分化の活性化剤や [1-4]，がんの原因である Hedgehog シグナルの阻害剤 [5]を見いだしてきた．本公演では近年の成果をいくつか紹介したい．

また我々は，病原菌が動物に感染した際に受ける免疫系からのストレスにより，休眠遺伝子が活性化され，病原菌が新規天然物を産生する現象を見いだした．病原放線菌 *Nocardia* 属や病原真菌 *Aspergillus* 属をマクロファージと共培養するという，微生物–動物細胞共培養法を開発した [6,7]．興味深いことに得られた天然物はマクロファージに毒性を有していた．このことから病原微生物は感染力を高めるために免疫を抑制する化合物を出す術を進化で得たのではないかと考え，そのような進化を「浸潤進化（invasive evolution）」と名付け [8]，研究を行っている．

1) *Chem. Sci.* **2016**, *7*, 1514-1520, 2) *J. Nat. Prod.* **2017**, *80*, 1853-1859, 3) *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 1381, 4) *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 21433, 5) *ACS Chem. Biol.* **2018**, *13*, 2551-2559, 6) *J. Nat. Med.* **2018**, *72*, 280-289, 7) *Org. Lett.* **2018**, *20*, 5831-5834, 8) *J. Antibiot.* in press.

Our research group has constructed two new methods for search bioactive natural products. The first one is “target protein oriented natural products isolation (TPO-NAPI) methods” using protein-immobilized beads. Recently, we isolated several molecular signaling inhibitors using Hes1 beads,[1-4] GLI1 beads[5] and NICD beads. Protein beads are mixed with natural products extract, then protein binders are found by HPLC for quick isolation. The second one is microorganism-animal cells co-incubation method.[6,7] Pathogenic microorganisms such as *Nocardia* and *Aspergillus* species might have “stress” by immune cells when they infected animals. Pathogenic microorganisms might be supposed to “activate” cryptic DNA and “produce” new natural products which have bioactivity for survival from immune system. Also, such abilities might be the result of “invasive evolution”.[8] We will present our recent results about these approaches.

natural products, protein beads, pathogenic microorganisms

講演番号：2DS-05
講演日時、会場：3 月 19 日 16:40～ ミーティングルーム D

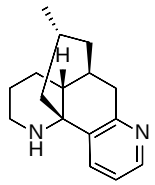
三次元構造を持つリコポジウムアルカロイドの全合成：活性発現の構造要因の解明を目指して

Total Synthesis of Lycopodium Alkaloids and Their SAR Studies

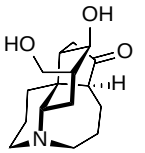
○塚野 千尋（京大院農）
○Chihiro Tsukano (Kyoto Univ.)

リコポジウムアルカロイドはヒカゲノカズラ科の植物 *Lycopodium* 種より単離される多環性アルカロイドである。これら天然物は主に $C_{16}N$ または $C_{16}N_2$ の骨格で、3 つまたは 4 つの環が複雑に縮環した独特の三次元構造で特徴付けらる。これまでに 250 以上の天然物が単離されているが、その生物活性は多様であり、アセチルコリンエステラーゼ阻害活性、抗腫瘍活性や抗ウイルス活性などを示すことが報告されている。我々はリコポジウムアルカロイドの三次元構造がその生物活性発現に重要であり、天然物からは誘導化できない類縁体を合成して構造活性相関を展開することで、活性発現の構造要因を解明することを目指している。得られた知見に基づき、三次元構造を自在に修飾して新しくケミカルスペースを拡張すれば、より強力な生物活性をもつ化合物が創製できるのではないかと期待している。

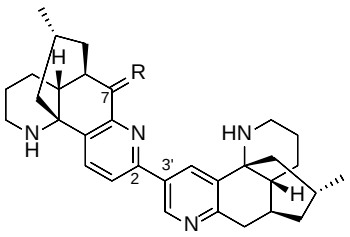
これまでにリコジンとその二量体型アルカロイド・コンプラナジン類の全合成を達成している。コンプラナジン類は神経成長因子の分泌を促すことが報告されており、これを指標に二量体構造に着目した構造活性相関を展開した[1,2]。また、最近では抗腫瘍活性を示すリコネシジン B を全合成し、三次元構造を酸素官能基化する合成経路を確立している[3]。本発表では、その取り組みについて紹介する。



Lycodine



Lyconesidine B (**1**)



R = H_2: complanadine A
R = O : complanadine B

Lycodine, complandines, and lyconesidine B, isolated from the club moss *Lycopodium sp.*, were characterized by nitrogen-containing unique and complex cyclic systems. These *lycopodium alkaloids* exhibit a variety of biological activity including induction of secretion of neurotrophic factors and cytotoxicity. To disclose relationships between the unique three-dimensional structure and biological activity, we are engaged in the synthesis of this class of alkaloids. To date, we have achieved total syntheses of these *lycopodium alkaloids* and investigated a structure-activity relationship.[1-3] The detail will be reported in this presentation.

1) Zhao, L.; Hirama, M.; Tsukano, C. *et al. Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 1722.
2) Zhao, L.; Hirama, M.; Tsukano, C. *et al. Chem. Eur. J.* **2016**, *23*, 802.
3) Kurose, T.; Tsukano, C.; Takemoto, Y. *et al. Org. Lett.* **2020**, *ASAP*.

total synthesis, structure-activity relationship, lycopodium alkaloid

講演番号：2DS-06
講演日時、会場：3 月 19 日 17:05～ ミーティングルーム D

デリバリーヘッド改変による骨細胞機能の in vivo イメージング

Alternation of probe delivery for osteocytes in vivo imaging

○菊地 和也[1,2]、橋本 龍[1]、蓑島 維文[1,2] ([1]阪大工、[2]阪大免フロ)
○Kazuya Kikuchi[1,2], Ryu Hashimoto[1], Masafumi Minoshima[1,2] ([1]Osaka Univ., [2]iFReC, Osaka Univ.)

骨組織では様々な細胞の働きにより骨代謝が行われ、恒常性が維持されている。骨細胞は骨を形成する骨芽細胞が分化したものであり、骨組織内部の骨小腔に広く分布している。骨細胞は周辺の骨を溶解することが示唆されているが、本現象は生きた動物で観察されておらずいまだに議論の余地が残されている。この骨細胞の機能を探索する新たな蛍光プローブとして、送達部位となるビスフォスホネート構造をこれまでの alendronate から、より骨への親和性の低い risedronate に変更した化合物を設計した。骨への親和性が下がることで骨表面より内部への浸透が可能になると考えた。pH 応答性色素として BODIPY 誘導体を用い、risedronate を連結させたプローブを合成した。プローブをマウスに投与し二光子励起顕微鏡によるイメージングを行ったところ、骨表面の一部より蛍光シグナルが得られ、以前の研究と同様に破骨細胞の活性が見られた。さらに骨組織内部を観察したところ、骨小腔の輪郭に沿って円盤状の蛍光シグナルが得られた。この結果は骨組織内部まで本プローブが送達され、骨細胞が存在する骨小腔における低 pH 環境を初めて可視化できた結果と考えられる。

One of the great challenges in the post-genome era is to clarify the biological significance of intracellular molecules directly in living systems. If we can visualize a molecule in action, it is possible to acquire biological information, which is unavailable if we deal with cell homogenates. One possible approach is to design and synthesize chemical probes that can convert biological information to chemical output.

Intravital imaging by two-photon excitation microscopy has been widely utilized to visualize cell functions. Skeletal bone structures undergo continuous remodelling through the coordinated asynchronous action of osteoclasts that remove bone and osteoblasts that generate new bone. A new fluorescent probe containing a risedronate fragment with moderate bone-binding affinity, pHocas-RIS, are used to visualize the pH environment of osteocytic lacunae in bone tissue. This new probe, pHocas-RIS, was shown to penetrate into deep bone tissues, which enabled in vivo imaging of osteocytic lacunae containing osteocytes in acidic microenvironments. Imaging studies using pHocas-RIS in transgenic mice expressing fluorescently labeled osteoclasts has proven that osteocytes help unravel the function dynamics of these bone remodeling cells that exist deep within the interior of bone tissues.

Chemical Biology, Fluorescent Probe, in vivo Imaging

講演番号：2ES-01
講演日時、会場：3 月 19 日 15:00～ ミーティングルーム E

安定同位体を用いた脂質研究
Lipids study using stable isotope

○後藤 直宏（海洋大）
○Naohiro Gotoh (Tokyo Univ. Mar. Sci. & Tech.)

脂質は３大栄養素の１つである。その役割としてはエネルギー源、局所ホルモン合成原材料、細胞膜構成成分など多岐に渡る。脂質において重要な役割を果たすのは誘導脂質に分類される脂肪酸である。これには飽和脂肪酸（パルミチン酸など）、モノ不飽和脂肪酸（オレイン酸など）、多価不飽和脂肪酸（リノール酸、アラキドン酸、DHA など）のように多くの構造体があり、脂肪酸の種類により動物体内での役割や機能が異なってくる。しかし、体外から動物体内へ取り込まれたこれら脂肪酸がどのように代謝されるか、もしくは体内へ分布していくのかを観察することは難しい。なぜならば、投与した脂肪酸と既に体内に存在する脂肪酸を区別できないからである。そこで我々はこれまで、^{13}C や重水素（^{2}H、D）を脂肪酸に導入する技術を用い、分子量を変化させた脂肪酸を動物へ投与することで、脂肪酸の体燃焼性評価や体内分布を同位体比質量分析（IRMS）やイメージング質量分析（IMS）を用いて評価してきた。さらに代表的脂質であるトリアシルグリセロール（TAG）中の脂肪酸結合位置が脂肪酸の代謝へどのように影響を与えるかなど、脂質の構造と脂肪酸の代謝性に関しても安定同位体脂肪酸を用い明らかにしてきた。そこで今回は、①体燃焼性の脂肪酸種間での比較、②TAG 結合位置が脂肪酸の体燃焼性に与える影響、③投与したアラキドン酸および DHA の脳内蓄積の視覚化、の主に３点に関する研究結果を報告する。

An important role in lipids is played by fatty acids. These are consisted of many structures such as saturated fatty acids (e.g., palmitic acid), monounsaturated fatty acids (e.g., oleic acid), and polyunsaturated fatty acids (e.g., linoleic acid, arachidonic acid, DHA), and the roles and functions of these fatty acids in the animal are different among fatty acid species. However, it is difficult to observe how these fatty acids taken into the animal body are metabolized or distributed in the body. This is because it is not possible to distinguish between administered fatty acids and those that are already present in the body. Therefore, we have developed techniques to introduce ^{13}C and deuterium (^{2}H, D) into the fatty acids to alter molecular weight of the fatty acids. These stable isotope labeled fatty acids were administrated to animals to assess the catabolism rate of fatty acid and distribution of fatty acids in the body using isotope ratio mass spectrometry and imaging mass spectrometry. In this presentation, I will report the following three topics: (1) comparison of catabolism rate among fatty acid species, (2) the effect of fatty acid binding position in triacylglycerol on the catabolism rate of fatty acids, and (3) the visualization of administered arachidonic acid and DHA accumulated in brain.

Lipids metabolism, Lipids accumulation, Stable isotope

講演番号：2ES-02
講演日時、会場：3 月 19 日 15:35～ ミーティングルーム E

高脂肪食摂取による代謝変動と 12α水酸化胆汁酸の分泌増大

Increased 12α-hydroxylated bile acids and alteration of metabolism by a high-fat diet

○石塚 敏（北大農）
○Satoshi Ishizuka (Hokkaido Univ.)

食事脂質は個体の活動を支える貴重なエネルギー源である。食事脂質や脂溶性ビタミン等の栄養素の吸収に寄与する胆汁酸は、体内での情報伝達分子として作用することが明らかにされた。体内には多様な胆汁酸分子が存在し、それらの役割は必ずしも同等ではないことが示唆されている。最近、ステロイド骨格の 12 位に水酸基を持つ 12α 水酸化胆汁酸（12αOH BA）と、それを持たない非 12α 水酸化胆汁酸の間での作用の相違が報告されるようになってきた。我々はラットを用いた実験で、体内の多様な胆汁酸組成を臓器や体液、消化管内容物などで評価する系を確立し、高脂肪食摂取が 12αOH BA の胆汁分泌が亢進すること、その排泄は摂取エネルギー過多の状態を良好に反映することを見出した。体内の正常な胆汁酸代謝を損なわない程度に 12αOH BA の中の一次胆汁酸であるコール酸を飼料に添加することで、高脂肪食摂取時の胆汁酸代謝を模倣する系を構築した。その結果、肥満を伴わない肝脂質蓄積や、高脂肪食摂取時に見られる腸内細菌叢の変動など、非感染性疾患で観察される多様な症状が引き起こされることを見出した。ここでは、胆汁酸の構造、代謝、健康維持における胆汁酸の役割について述べる。

Dietary lipids are precious energy source which energize individual activities. Bile acid (BA) contributes to absorption of dietary lipids and vitamins and also serves as a signaling molecule in the body. There are a variety of BA molecules, and the roles are not necessarily identical among the BA molecules. Recently, researchers have reported difference of the roles of BAs depending on hydroxylation at position 12, namely between 12α-hydroxylated (12αOH) BAs and non-12αOH BAs. We established system to analyze BA compositions in organs, body fluid and intestinal contents in rats. Based on this method, we observed a high-fat (HF) diet raises bile 12αOH BA secretion, which sharply reflects the excessive food intake. Such metabolism of 12αOH BA in HF-fed condition can be mimicked by a dietary supplementation of cholic acid (CA), the primary BA in 12αOH BA, not to disturb normal BA metabolism in the body. Consequently, the CA supplementation induces hepatic steatosis without obesity and alteration of intestinal microbiota, which are frequently found to be in noncommunicable diseases. Here, I will discuss the structures, structures, metabolism, and their roles of BAs in health maintenance.

bile acid, metabolism, high-fat diet

講演番号：2ES-03
講演日時、会場：3 月 19 日 16:10～ ミーティングルーム E

実生活レベルの過酸化脂質の消化・吸収

Digestion and absorption of lipid peroxides at real-life levels

○仲川 清隆（東北大農）
○Kiyotaka Nakagawa (Tohoku Univ.)

脂質は生命活動にとって必須な分子の一つであり、私たちは食事を通じて常に脂質を摂取し、その多様な機能性（例えば、エネルギー源や生理活性物質などとしての働き）を日々享受している。そして当然のことながら、食事脂質がこうした機能性を示すことと、脂質が腸管からからだに取り込まれ複雑な過程を経て消化・吸収・分布されることには密接な関係がある。また私たちは、通常の脂質とともに、少なからず酸化した脂質（過酸化脂質）も摂取しており、こうしたことの生体への影響を明らかにするうえでも、脂質ならびに過酸化脂質の消化・吸収・分布の理解を深めることが望まれている。こうした中、演者らは LC-MS/MS による過酸化脂質の精密分析法を構築し[1, 2]、普段の食事に含まれる程度の過酸化脂質（とくに、トリアシルグリセロールヒドロペルオキシド : TGOOH）をラットに与え、消化・吸収・分布の解明を試みている。例えば、胸管リンパカニュレーション手術を施したラットに ppm オーダーの TGOOH を投与し、胸管から回収したリンパ液を LC-MS/MS で解析したところ、リンパ液から TGOOH そのものが明瞭に検出された。したがって、従来の学説では TGOOH は吸収されないとされてきたものの、本研究から、TGOOH はその一部が腸管吸収を経てリンパ液へと移行し、体内に吸収されると予期される。この更なる証明に向けて、現在、安定同位体標識 TGOOH を用いた評価を進めている。こうした取り組みにより、過酸化脂質の消化・吸収・分布の理解が深まり、生体への影響との関係がより明確になると期待される。

Since we ingest lipid hydroperoxides through the daily intake of foods, a better understanding on the digestion/absorption/distribution of lipid hydroperoxides is desired to clarify their effects on human health. We evaluated the fate of lipid hydroperoxide (i.e., triacylglycerol hydroperoxide, TGOOH) using our previously developed LC-MS/MS method [1, 2], and found that dietary TGOOH may be absorbed from the intestine. To verify this possibility, we are currently conducting further evaluation using deuterium labeled-TGOOH.

[1] Kato, S., *et al.*, *npj Science of Food*, 2 (2018)
[2] Rahmania, H., *et al.*, *Sci Rep*, 10 (2020)

Lipid peroxides, Digestion, Absorption

講演番号：2ES-04
講演日時、会場：3 月 19 日 16:45～ ミーティングルーム E

調理工程における食用油脂の酸化について

Oxidation of oils in cooking process

○今義 潤 (株式会社 J-オイルミルズ)
○Jun Imagi (J-OIL MILLS,INC.)

脂質は、エネルギーのみならず必須脂肪酸の供給源ともなる重要な栄養素である他、脂溶性ビタミンの担体としての機能や、生体調節機能も有する重要な食品成分である。脂質の主な供給源として、食品そのものに含まれるものの他に、調理時に使う食用油が挙げられる。ただし、脂質は酸素と接触することにより酸化されることから、特に高温に晒される揚げ・炒め調理に使用する食用油は酸化しやすい。このことから、調理過程における食用油の酸化挙動を知ることは、重要なことと考えられる。しかし一方で、高温の揚げ・炒め調理において、酸化により生じた脂質過酸化物は速やかに二次的な酸化反応により分解されることから、単に過酸化価を測定しても、調理過程における食用油の酸化状態を知ることはできない。

一方で、近年 LC-MS/MS 等の分析機器や分析方法の進歩により、酸化された脂質やその分解物の分析が定量的にできるようなってきた[1]ことから、我々は揚げ調理、炒め調理に用いた油を分析し、その酸化、劣化の状態の解析を試みている。これまでに多少の知見を得るに至ったことから、今回その一部を報告する。また、酸化した食用油は、不快な酸化臭の元となり調理品の風味を低下させるが、それ以外に調理品に好ましい風味を与える場合もあり、これらについての検討結果も併せて述べることとする。

Lipids are important nutrients that serve as a source of essential fatty acids as well as energy, and also have a function as a carrier for fat-soluble vitamins. Cooking oil along with those contained in the food itself is a major source of fat. Cooking oil tends to undergo an oxidation reaction due to the high temperature. It is important to know the oxidizing behavior of the oils in the cooking process. However, hydroperoxide generated by oxidation during cooking is rapidly decomposed by a secondary oxidation. Therefore, it is not possible to know the oxidation state of cooking oil during the cooking process by simply measuring the peroxide value.

Recently, advances in analytical instruments such as LC-MS/MS and analytical methods have made it possible to quantitatively analyze lipids and their decomposition products. Therefore, we analyzed the oil used for fried cooking and stir-fried cooking.

[1] Kato, S., *et al.*, *npj Science of Food*, 2 (2018)

oil, oxidation, cooking

講演番号：2FS-01
講演日時、会場：3 月 19 日 15:05～ ミーティングルーム F

黄麹菌における有用物質生産に関連する膜交通の分子機構

Molecular machinery of membrane traffic related to valuable material production in the yellow *Koji* mold *Aspergillus oryzae*

○樋口 裕次郎（九大農）
○Yujiro Higuchi (Kyushu Univ.)

麹菌は、米や麦、豆などの穀類に生育させた麹として各種の有用酵素や有機酸の供給源として利用され、日本の発酵・醸造産業で必要不可欠な真核微生物です。それ故に我が国を代表する微生物として、国菌に認定されています。糸状菌である麹菌は、多核多細胞であるといった研究対象として扱いが難しいことなどを理由に、モデル真菌に比べて研究は遅れていました。しかし、その優れた有用物質生産能力への興味と応用への期待から、基礎から応用まで広くカバーする農芸化学らしい研究がこれまでに展開されてきました。本シンポジウムでは、国菌である黄麹菌、黒麹菌、白麹菌の若手研究者により、それぞれの特徴を活かした最新の研究成果について紹介します。私からは、黄麹菌における有用酵素や二次代謝産物生産に関わる膜交通（メンブレントラフィック）の分子機構について、最近の知見を紹介します。具体的には、菌糸細胞内をダイナミックに動き回る初期エンドソーム動態が、有用物質生産性に関与することがわかってきました。また、有用酵素タンパク質の mRNA の細胞内局在について新規知見を見出しました。本シンポジウムを通じて、個別の麹菌研究についての理解を一層深めるとともに、得られた知見を統合することにより、それぞれの麹菌種において解明が進んでいる分子機構や、逆に未解明の課題について議論する機会を提供したいと考えております。これにより、麹菌の網羅的な研究の発展を促進し、国菌・麹菌学として一体的に研究を進める有用性を提言します。

The yellow *Koji* mold *Aspergillus oryzae*, the black *Koji* mold *Aspergillus luchuensis* and the white *Koji* mold *Aspergillus luchuensis* mut. *kawachii* have been used as producers of valuable enzymes and organic acids in fermentation and brewing industries in Japan, and therefore recognized as the Japanese national fungi. Although *Koji* molds as filamentous fungi are not amenable to investigate as they are multi-nuclear and -cellular organisms, many researches have been conducted for further production of valuable materials. In this symposium, we younger researchers studying *A. oryzae*, *A. luchuensis* and *A. kawachii* present recent discoveries that reflect characteristics of each *Koji* mold. I talk about molecular machinery of membrane traffic related to production of valuable enzymes and secondary metabolites in *A. oryzae*; for example, involvement of early endosome dynamics in these material production. Through this symposium, we would like you to understand more in detail about each *Koji* mold research. In addition, we would provide an opportunity to discuss understanding molecular mechanisms and unsolved challenges in each *Koji* mold by organizing recently obtained new findings. Finally, we would like to present usefulness of comprehensive analysis of *Koji* molds for future research development.

Aspergillus oryzae, membrane traffic, valuable material production

講演番号：2FS-02
講演日時、会場：3 月 19 日 15:25～ ミーティングルーム F

黄麹菌における加水分解酵素遺伝子の発現制御機構

Regulatory mechanism of hydrolytic enzyme genes expression in the yellow *Koji* mold *Aspergillus oryzae*

○田中 瑞己（静県大食栄）
○Mizuki TANAKA (Univ. Shizuoka)

黄麹菌 *Aspergillus oryzae* が生産する加水分解酵素は、醸造産業、食品加工産業、医薬品産業などにおいて幅広く利用されている。糸状菌の加水分解酵素遺伝子の発現は、多くの場合、誘導基質が存在する条件で特異的に誘導される。これまでに黄麹菌の加水分解酵素遺伝子の発現誘導に関わる様々な転写因子が同定されており、その発現制御機構の解明が進められている。また、糖質加水分解酵素遺伝子の発現は、グルコースが存在する条件ではカーボンカタボライト抑制によって抑制されることが知られている。糸状菌におけるカーボンカタボライト抑制の制御機構は長年に渡り不明であったが、黄麹菌のアミラーゼ遺伝子発現をモデルとした最近の研究により、その一端が明らかとなりつつある。さらに、黄麹菌においてはアミラーゼの生産によって小胞体ストレスが誘導されるが、小胞体ストレスに応答してアミラーゼ遺伝子の mRNA を切断する機構の存在も示唆されている。本発表では、これまでに明らかとなっている黄麹菌の加水分解酵素遺伝子発現の制御機構について整理し、今後の研究の展望について議論する。

The hydrolytic enzymes produced by the yellow *Koji* mold *Aspergillus oryzae* are widely used in various industries such as the brewing, food processing, and pharmaceutical industries. Expression of most hydrolytic enzyme genes in filamentous fungi is specifically induced under conditions where the inducing substrate is present. Various transcription factors involved in the induction of the hydrolytic enzyme genes expression in *A. oryzae* have been identified, and the regulatory mechanisms of their expression have been investigated. It is also known that the expression of glycoside hydrolase genes is repressed by carbon catabolite repression in the presence of glucose. The regulatory mechanism of carbon catabolite repression in filamentous fungi has been unclear for many years. However, recent studies using *A. oryzae* α-amylase gene expression as a model partly reveal this mechanism. In addition, endoplasmic reticulum (ER) stress is induced by the production of amylolytic enzymes, and it has also been suggested that the α-amylase mRNA is cleaved in response to ER stress. In this presentation, we will summarize the regulatory mechanism of hydrolytic enzyme gene expression in *A. oryzae*, and discuss the prospect for future research.

Aspergillus oryzae, Gene expression, Transcription factor

講演番号：2FS-03
講演日時、会場：3 月 19 日 15:50～ ミーティングルーム F

黄麹菌による清酒醸造における糖化と糖転移

Saccharification and transglycosylation by *Aspergillus oryzae* during sake-brewing

○徳岡 昌文（東農大応生）
○Masafumi Tokuoka (Tokyo Univ. Agric.)

黄麹菌は清酒醸造において並行複発酵の「糖化」を担う。糖化は米澱粉がグルコースに分解される反応と単純に捉えられがちであるが、糖化を担う酵素の一つであるα-グルコシダーゼは糖化と並行して糖転移化合物を生成する。例えば、非発酵性糖であるコージビオースやサケビオースはその名のとおり醸造物から見つかった糖であり、グルコースへの糖転移により合成される。また配糖体のエチルα-グルコシド（α-EG）やグリセリルα-グルコシド（α-GG）は、酵母が生成したエタノールやグリセロールへの糖転移により合成され、並行複発酵に特徴的な化合物である。これら糖転移化合物は清酒のグルコースを除いた不揮発性成分の多くを占めることから、清酒の品質を考える上で麹菌による糖転移作用が重要であることが分かる。本シンポジウムでは、最近発見された、並行複発酵において生成する新規配糖体のエチルα-イソマルトシドとエチルα-マルトシド及び、新規オリゴ糖である重合度６～８の清酒オリゴ糖についての研究について、麹菌α-グルコシダーゼによる糖転移との関りを含め紹介する。

Aspergillus oryzae is involved in the saccharification during sake-brewing. Although saccharification is considered a process in which rice starch is simply digested into glucose, the process includes another enzymatic reaction known as transglycosylation. The transglycosylation products including non-fermentable sugars, as kojibiose and sakebiose, and glycosides, as ethyl α-glucoside (α-EG) and glyceryl α-glucoside (α-GG), have been discovered in brewed products. α-EG and α-GG are unique compounds that are specifically produced in multiple-parallel fermentation. Aside from glucose, a large portion of the non-volatile compounds in sake is composed of these transglycosylation products, indicating the importance of transglycosylation in sake brewing. In this symposium, I would like to introduce the research on the novel glycosides, ethyl α-isomaltoside and ethyl α-maltoside, and novel oligosaccharides with degree of polymerization 6 to 8 in sake, as well as the involvement of transglycosylation by *A. oryzae* α-glucosidases in the generation of these compounds.

Aspergillus oryzae, Sake-brewing, Transglycosylation

講演番号：2FS-04
講演日時、会場：3 月 19 日 16:15～ ミーティングルーム F

黒麹菌の細胞壁α-グルカン、黄麹菌と何が同じで何が違う？

The difference of the cell wall α-glucan in *Aspergillus luchuensis* and *Aspergillus oryzae*.

○水谷 治[1,2]、上地 敬子[1]、渡嘉敷 直杏[2] ([1]琉球大農、[2]鹿児島連大農)
○Osamu Mizutani[1,2], Keiko Uechi[1], Jikian Tokashiki[2] ([1]Univ. Ryukyus, [2]Kagoshima Univ.)

黒麹菌 *Aspergillus luchuensis* は、泡盛や焼酎の醸造に用いられる産業微生物であり、黄麹菌 (*Aspergillus oryzae*) とともに日本醸造学会より国菌として認定されている。同じ麹菌と名乗っていることから黄麹菌で理解されていることは、多くの場合、黒麹菌でもあてはまることが多い。細胞壁組成においても黄麹菌と同様に黒麹菌は、α-1,3-グルカン、β-1,3/1,6-グルカン、キチンといった多糖で構成されている。一方、黒麹菌は、黄麹菌には存在しない細胞壁多糖であるニゲランという細胞壁 α-グルカンの一種を合成する。ニゲランは、D-グルコースが α-1,3-と α-1,4-結合を交互に繰り返す直鎖状の細胞壁多糖であり、一部の *Aspergillus* 属や *Penicillium* 属糸状菌が窒素源飢餓時に合成することが知られている。本シンポジウムでは、黒麹菌の主要な α-1,3-グルカン合成酵素遺伝子 (*AlagsE*) とニゲラン合成酵素遺伝子 (*AlagsB*) について発見の経緯や現在までに明らかになってきた研究成果を紹介し、今後の研究の展開等について議論したい。

Aspergillus luchuensis is an important industrial fungus same as *A. oryzae* in Japan, which is used widely for brewing traditional Japanese distilled spirits, such as awamori and shochu. In many cases, what has been shown through research with *A. oryzae* is also true for *A. luchuensis*. The cell wall in *A. luchuensis* is composed of polysaccharides such as α-1,3-glucan, β-1,3/1,6-glucan and chitin, which is the same as that in *A. oryzae*. In contrast, *A. luchuensis* specifically produce the cell wall polysaccharides called nigeran which cannot be produced in *A. oryzae*. The nigeran, which is an unbranched D-glucan consisting of alternating α-1,3- and α-1,4-glucoside linkages, is known to be produced under the nitrogen-starved conditions in some filamentous fungi of *Aspergillus* and *Penicillium* spp. In this symposium, we would like to introduce the discovery of a major α-1,3-glucan synthase gene, *AlagsE*, and a nigeran synthase gene, *AlagsB*, and the progress of research on these genes, and discuss the future development of research.

Aspergillus luchuensis, α-1,3-glucan, nigeran

講演番号：2FS-05
講演日時、会場：3 月 19 日 16:40～ ミーティングルーム F

黒麹菌による泡盛中の香気物質 1-オクテン-3-オールの生合成について

Biosynthesis of aroma compound 1-octen-3-ol in awamori by *Aspergillus luchuensis*

○渡邉 泰祐（日大生資科）
○Taisuke Watanabe (Nihon Univ.)

近年、麹菌が発酵最終産物の香気物質生成に寄与することが注目されている。我々は沖縄県を代表する蒸留酒である泡盛の主要な香気物質の一つである 1−オクテン−3−オールに着目した。本化合物は、マツタケ等のキノコ類、*Aspergillus* 属糸状菌による生成が報告されている。我々は、GCMS 分析によって、黒麹菌が米麹において 1-octen-3-ol を生産していることを明らかにした。その生合成には脂肪酸オキシゲナーゼ *ppoC* の関与が予想されたため、*ΔppoC* 株を構築した。*ΔppoC* 株と親株の間には、生育や分生子形成に顕著な差異はなかったが、*ΔppoC* 株で調製した麹から 1-octen-3-ol は検出されなかった。したがって、*ppoC* は米麹における黒麹菌の 1-octen-3-ol 生合成必須因子であることが示された。黒麹菌の *ΔppoA* 株、*ΔppoC* 株、*ΔppoD* 株を用いた泡盛小仕込み試験を実施した結果、*ΔppoA* 株および *ΔppoD* 株で調製した泡盛蒸留液における 1-octen-3-ol 含有量は、いずれも親株の約 1.2 倍であったのに対し、*ΔppoC* 株で調製した泡盛蒸留液からは検出されなかった。したがって、泡盛中の 1-octen-3-ol は黒麹菌の *ppoC* によって生合成され、醸造工程におけるその他の因子が生成に直接関与しないことが示された。現在、*ppoC* の発現制御を含む 1-octen-3-ol 生合成機構の解析を進めている。

Recently, it has been noted that *Koji* mold contributes to the production of aroma compounds in the fermentation end product. We focused on 1-octen-3-ol, one of the main aroma compounds of Awamori, which is a representative distilled liquor in Okinawa Prefecture, Japan. It has been reported that this compound is produced by mushrooms and *Aspergillus* species. We revealed that the black *Koji* mold *Aspergillus luchuensis* produces 1-octen-3-ol in rice koji by GCMS analysis. We predicted that the fatty acid oxygenase *ppoC* was would be involved in 1-octen-3-ol biosynthesis, and then Δ*ppoC* strain was constructed. There were no significant differences in growth or conidiation between Δ*ppoC* strain and the parent strain, but 1-octen-3-ol was not detected in the koji prepared with Δ*ppoC* strain. Therefore, it was shown that *ppoC* is an essential factor for 1-octen-3-ol biosynthesis in rice koji by *A. luchuensis*. Awamori fermentation test was performed with Δ*ppoA* strain, Δ*ppoC* strain, and Δ*ppoD*. The 1-octen-3-ol content in the awamori distillate prepared with Δ*ppoA* strain and Δ*ppoD* strain was about 1.2 times that of the parent strain, whereas it was not detected in that of Δ*ppoC* strain. Therefore, it was shown that 1-octen-3-ol in awamori was biosynthesized by *ppoC*, and that other factors in the brewing process were not directly involved in the production. We proceed to the analysis of the 1-octen-3-ol biosynthesis mechanism including the regulation of *ppoC* expression.

1-octen-3-ol, *Aspergillus luchuensis*, awamori

講演番号：2FS-06
講演日時、会場：3 月 19 日 17:05～ ミーティングルーム F

白麹菌のクエン酸高分泌生産に関わるトランスポーターの解析

Characterization of citrate transporters in the white koji fungus

○二神 泰基[1]、門岡 千尋[2]、後藤 正利[3]、玉置 尚徳[1] ([1]鹿児島大農、[2]筑波大生環、[3]佐賀大農)
○Taiki Futagami[1], Chihiro Kadooka[2], Masatoshi Goto[3], Hisanori Tamaki[1] ([1]Kagoshima Univ., [2]Tsukuba Univ., [3]Saga Univ.)

焼酎製造に用いられる白麹菌 *Aspergillus luchuensis* mut. *kawachii* は、清酒、味噌、醤油などの製造に用いられる黄麹菌 *Aspergillus oryzae* とは異なり多量のクエン酸を分泌生産する性質をもつ。クエン酸には醪の pH を下げて菌汚染を防ぐ重要な役割があり、安定した焼酎製造を可能にしている。我々の研究グループでは、なぜ白麹菌がクエン酸を高分泌生産できるのかについて解析を行った。クエン酸はミトコンドリア内で進行するクエン酸回路の中間代謝物として生成され、細胞質、細胞外へと排出される。クエン酸を高生産するには、効率的なクエン酸の排出が重要であると指摘されていた。そこで我々は、クエン酸輸送体について解析した。まず、白麹菌においてミトコンドリア内から細胞質にクエン酸を排出する CtpA と YhmA を解析した[1)]。*ctpA* と *yhmA* の二重破壊は最少培地で合成致死となったが、酢酸を含有する条件では生育できた。よって、これらのミトコンドリア局在クエン酸輸送体により細胞質に排出されたクエン酸は、アセチル CoA 合成の出発物質としての重要な役割があることが分かった。次に、細胞質から菌体外にクエン酸を排出する輸送体として CexA を解析した[2,3)]。白麹菌において *cexA* を破壊すると劇的にクエン酸生産が減少したことから、CexA は主要な細胞膜局在クエン酸輸送体であることが示唆された。さらに、黄麹菌において白麹菌の *cexA* を発現させると、白麹菌と同等のクエン酸分泌生産能力を獲得した。加えて、黄麹菌のゲノムにもクエン酸輸送体遺伝子 *cexA* と *cexB* の 2 つを確認し、これらの遺伝子を強制発現させることでクエン酸分泌生産能力を付与できた。以上より、CexA は麹菌のクエン酸生産能力を決定付ける因子であると考えている。

The white koji fungus *Aspergillus luchuensis* mut. *kawachii* produces a large amount of citric acid during the process of fermenting shochu, a traditional Japanese distilled spirit. We characterized mitochondrial citrate transporters CtpA and YhmA and a plasma membrane-localized citrate transporter CexA by biochemical and gene disruption/overexpression analyses in the koji fungi. Our results indicated that CexA plays a critical role in the accumulation of extracellular citric acid in the koji fungi.

1) Kadooka, C. et al., *Appl. Environ. Microbiol.*, 2019;85:e03136-18.
2) Kadooka, C. et al., *Appl. Environ. Microbiol.*, 2020;86:e01950-19.
3) Nakamura, E. et al., *J. Biosci. Bioeng.*, 2020;S1389-1723(20)30334-0.

white koji, *Aspergillus luchuensis* mut. *kawachii*, citrate transporter

講演番号：2GS-01
講演日時、会場：3 月 19 日 15:00～ ミーティングルーム G

プラスミドの宿主域とゲノム塩基組成

Plasmid host range and genome nucleotide composition

○鈴木 治夫（慶大・環境情報）
○Haruo Suzuki (Environment & Info. Studies, Keio Univ.)

細菌細胞内の染色体外 DNA であるプラスミドは、細菌細胞間を水平移動し、宿主細菌に様々な機能（抗生物質耐性など）を付与することが知られている。このことから、プラスミドの宿主域に関する研究は、細菌の環境適応と進化に対する洞察を与える。我々は、公的データベースのゲノム配列を用いて、様々な細菌の染色体とプラスミドとの間の塩基組成（GC 含量、連続塩基[k-mer]頻度）を比較した。プラスミドは、既知の宿主の染色体に塩基組成が類似する傾向を示した。また、広宿主域プラスミド（不和合性群 IncP-1）は、狭宿主域プラスミド（不和合性群 IncF）と比較して、より多様な細菌の染色体に塩基組成が類似した。環境微生物群集を受容菌とするプラスミドの接合伝達実験で決定された接合伝達体の属する細菌属は、他の細菌属に比べ、プラスミドに染色体の塩基組成がより類似する傾向を示した。以上の結果より、プラスミドと細菌染色体との間の塩基組成の類似度から、プラスミドの宿主域を予測することが可能と考えられた。

Plasmids, which are extrachromosomal DNA in bacterial cells, are known to horizontally transferred between bacterial cells and confer various functions (such as antibiotic resistance) to host bacteria. Thus, researches on the host range of plasmids provide insights into the environmental adaptation and evolution of bacteria. Using genome sequences available in public databases, we compared nucleotide compositions (GC content and oligonucleotide [k-mer] frequencies) between plasmids and chromosomes of various bacteria. Plasmids tended to have nucleotide compositions similar to those of known hosts' chromosomes. Broad-host-range plasmids (incompatibility group IncP-1) plasmids had nucleotide compositions that are similar to those of diverse bacteria, while narrow-host-range plasmids (incompatibility group IncF) had nucleotide compositions that are similar only to closely related bacteria. Conjugative mating assays for plasmids using environmental microbial communities as recipients revealed that chromosomes of the bacterial genera to which transconjugants belonged tended to have more similar in nucleotide compositions to the plasmids than chromosomes of the other bacterial genera. Our results suggest that plasmid host range can be predicted from the similarity in nucleotide compositions between the plasmid and bacterial chromosomes.

Plasmid, Host range, Genome nucleotide composition

講演番号：2GS-02
講演日時、会場：3 月 19 日 15:25～ ミーティングルーム G

どのプラスミドが，どのようなときに，どこからどこに移るのだろうか

Behaviors of conjugative plasmids in environment

○新谷 政己[1,2,3] ([1]静大院・総合科技、[2]静大・グリーン研、[3]理研・BRC-JCM)
○MASAKI SHINTANI[1,2,3] ([1]Grad. Shc. Shizuoka Univ., [2]Shizuoka Univ. RIGST, [3]RIKEN, BRC-JCM)

プラスミドは微生物の生育に必須な染色体とは物理的に別に存在し，自律的に複製される遺伝因子である．また，その一部は，細胞間の接触を伴い，プラスミドをもつ細胞から持たない細胞へと接合伝達することで，自身を異なる細胞に世代を経ずに伝播できる．そのため，プラスミドの接合伝達は，微生物の進化・適応を促す重要な現象として知られてきた．しかし，自然界では「どのプラスミド」が「いつ」，「誰」から「誰」へと接合伝達するのかについては未解明のままである．我々は，プラスミドの接合伝達能を指標にして，日本各地の様々な環境試料（土壌，河川・湖沼底泥，下水処理場，家畜厩肥など）から，種々の接合伝達性プラスミドを収集した．その結果，既知のプラスミドの他に，これまで発見されていなかったプラスミドを数多く得ることに成功した．さらに，得られたプラスミドについて，各環境試料中にどの程度分布しているのかを調べたところ，IncP 群，PromA 群という不和合性群に属するプラスミドが，広く分布していることが判明した．特に，比較的新規性の高い，PromA 群に属する複数のプラスミドについては，複製・維持・接合伝達能というプラスミドの基本機能について比較を行った．その結果，これらのプラスミドは，綱の異なる細菌間を伝播可能であり，広い宿主域を示すプラスミドであった．以上のことは，自然界では，まだあまり知られていないプラスミドが広く分布しており，種々の細菌間を伝播していることを示唆している．講演ではプラスミドの伝播に影響を及ぼす環境因子についての最新の成果を示すとともに，既知のプラスミドとの関連性についても議論したい．

Conjugation of plasmid is one of the most efficient systems for spreading various genes among bacteria. Monitoring of plasmids' behaviors under natural conditions is important to understand bacterial evolution and adaptation mechanism, however; the behaviors has been not well-studied. The final goal of this study is to understand (i) which plasmids are transferred in microcosms, (ii) how often the plasmids spread under such conditions, or (iii) which bacteria can transfer the plasmid to which bacteria. Exogenous plasmid capturing methods enabled us to collect many kinds of self-transmissible plasmids including new groups of plasmids. Plasmids in the IncP and PromA groups were obtained from different environmental samples including soil, sediments of rivers or lakes, and manure of livestock. Basic features (replication, maintenance, and conjugative transfer) of the PromA plasmids were compared. These plasmids were able to be transferred to bacteria of different classes in *Proteobacteria*. Several environmental factors affecting the plasmid transferability will be discussed.

plasmid, conjugation, host range

講演番号：2GS-03
講演日時、会場：3 月 19 日 15:50～ ミーティングルーム G

IncP-1 型広宿主域プラスミドの伝達を左右する受容菌側因子の探索から何が見えるのか

What can we see from the search of the recipient factor for transmission of the IncP-1 type broad host range plasmid?

○守口 和基、鈴木 克周、清川 一矢、Zoolkefli Fatin Iffah Rasyiqah Mohamad (広島大統合生命)
○ Kazuki Moriguchi, Katsunori Suzuki, Kazuya Kiyokawa, Fatin Iffah Rasyiqah Mohamad Zoolkefli (Hiroshima Univ.)

IncP-1 型プラスミドはプロテオバクテリア門を広く宿主とする広宿主域プラスミドとして知られており、抗生物質耐性遺伝子などを広く拡散させる潜在性をもつ。興味深いことにそのプラスミド移行域はプロテオバクテリアを超え、古細菌や真核生物に及ぶことが報告されてきた。我々の研究グループでは、IncP-1 型プラスミドの接合伝達における受容側因子を明らかにするために、非宿主（出芽酵母）と宿主（大腸菌）のノックアウト変異株を受容菌としてゲノム網羅的な解析を長らく行なってきた。その結果、出芽酵母においては液胞型 ATPase 関連遺伝子群とミトコンドリア ATPase 関連遺伝子群のノックアウト変異株が、それぞれ主要な低下および上昇変異体として単離されてきた。これら ATPase がどのようなメカニズムで IncP-1 型プラスミドの接合伝達をそれぞれ促進及び抑制しているのか未だ明らかになっておらず、皆様のご意見を伺いたい。一方、大腸菌においては、生存及び接合体の選抜に用いた抗生物質に対する耐性確立に関与すると推察される、見かけ上の接合効率低下変異体は得られたものの、真に接合効率が上昇または低下する変異体は得られなかった。

IncP-1 プラスミドの受容が非宿主においては遺伝的な可塑性が高く宿主においては低いというこれらの結果は、接合伝達の主体が供与菌及び受容菌のどちら側にあるのか、元は細菌間の接合伝達装置であったと考えられる四型分泌装置が、如何に真核生物へのタンパク質／DNA 伝達装置としても分岐・進化していったのかを推察する上で重要な材料となるものと考える。広く議論をおこないたい。

IncP-1 plasmids are a group of broad host range plasmids found in proteobacteria. Interestingly, their transfer range is not limited to proteobacteria, but also even to eukaryotes and archaea. To clarify the recipient factors related to IncP-1 conjugal transfer, we have been trying to isolate such factors by genome-wide screenings using knock-out mutants of non-host (*S. cerevisiae*) and host (*E. coli*) organisms, respectively. In *S. cerevisiae*, mutants for Vacuolar-type ATPase genes and mitochondrial ATPase genes were isolated as majority of “down” and “up” mutants for conjugation efficiency, respectively. In the case of *E. coli*, on the other hand, neither of such mutants was isolated. These results may be important cues when considering the two queries, which are 1) master-servant relationship between donor and recipient, and 2) divergence and evolution of type-4 secretion system from conjugal transfer system in bacteria to protein/DNA transfer system into eukaryotes.

IncP-1 type broad host range plasmid, Genome-wide screening, Trans-kingdom conjugation

講演番号：2GS-04
講演日時、会場：3 月 19 日 16:15～ ミーティングルーム G

接合伝達の直後，細胞内では何が起きているのだろうか
Zygotic induction during plasmid conjugative transfer

○宮腰 昌利 (筑波大医)
○Masatoshi Miyakoshi (Univ. Tsukuba)

自己伝達性プラスミドは自身の複製、分配、接合伝達に必要な遺伝子群を整然と配置し、巧妙にその遺伝子発現を制御している。これらの遺伝子群はプラスミドが持つリプレッサーによって転写が抑制されている場合が多く、接合によって受容菌に伝達された際に一過的に誘導される (zygotic induction) と考えられてきた。演者は、極めて高い効率で接合伝達するプラスミド RP4 を利用して、接合伝達の際に一過的に誘導されるプラスミド遺伝子の転写産物をマイクロアレイを用いて検出することに成功した。さらに、転写阻害剤リファンピシンとその耐性株を用いてプラスミド供与菌と受容菌のトランスクリプトームを分離して解析したところ、プラスミド 2 本鎖 DNA のうち伝達鎖にコードされる遺伝子群は受容菌で転写誘導されること、また相補鎖の *oriT* 近傍に位置する遺伝子群が供与菌で転写誘導されることを明らかにした。接合伝達の際に受容菌と供与菌で起きる転写誘導とプラスミド複製に伴う時系列制御の新しいモデルを提唱したい。

Self-transmissible plasmid organizes genes for its own replication, partition and conjugative transfer and coordinates the gene expression. Plasmid genes often are under the control of autogenous repressors, and therefore it has been assumed that they are transiently expressed in new recipient cells after conjugative transfer (zygotic induction). Use of RP4 plasmid which transfers at extremely high efficiencies enabled us to detect these transient transcripts during conjugation by microarray. Moreover, taking advantage of transcription inhibitor rifampicin, we have separately analyzed the transcriptomes of recipient and donor cells. Our data show that many genes on the transfer strand are induced in recipient cells while a few genes adjacent to the origin of transfer (*oriT*) are induced in donor cells. I would like to propose a new model that zygotic induction enables continuous plasmid replication in recipient and donor cells during conjugative transfer.

zygotic induction, conjugative transfer, plasmid

講演番号：2GS-05
講演日時、会場：3 月 19 日 16:40～ ミーティングルーム G

細菌は接合伝達で獲得したプラスミドにどのように「順応」するのか？

Adaptation process of the host bacteria after plasmid acquisition by conjugation

○水口 千穂[1,2]、野尻 秀昭[1,2] ([1]東大・生物工学セ、[2]東大・微生物連携機構)
○Chiho SUZUKI-MINAKUCHI[1,2], Hideaki NOJIRI[1,2] ([1]BRC, UTokyo, [2]CRIIM, UTokyo)

一般にプラスミド保持は宿主細菌にとって生育負荷となるが、その原因の一つに、プラスミド保持に伴う染色体上遺伝子の転写量の変化が挙げられる。当研究室ではこれまでプラスミド保持株と非保持株のトランスクリプトーム比較を行うことにより、プラスミド保持に伴い中央代謝系に関する遺伝子やプロファージ領域、鉄獲得に関する遺伝子の転写量が変化すること等を示してきた。これらの実験で使用してきたプラスミド保持株とは、接合伝達によりプラスミドを保持させた後、複数回の培養を経て取得したものであり、プラスミドを獲得してから十分に長い時間が経過したものである。では宿主細菌はプラスミドを獲得した後、どのくらいの時間で、どのようにプラスミドを保持する状態に「順応」していくのだろうか？

我々はこの過程を明らかにするため、接合伝達直後の細胞を分取し、分取直後から培養過程で経時的にトランスクリプトーム解析を行った。プラスミドには LacI 抑制型プロモーターの下流に *gfp* 遺伝子が存在する pBP136::*gfp* (Shintani et al., 2014, AEM, 80:138-45) を使用し、供与菌、受容菌として *Pseudomonas* 属細菌を使用した。供与菌を *lacI*^{q} 株とすることで、接合伝達体のみが GFP 蛍光を発することを確認した。接合開始後 2 時間で、GFP の蛍光を指標にフローサイトメーターで接合伝達体を分取した直後と、その後培養を経た細胞について RNA-Seq 解析を行った。その結果、細胞分取の操作による影響が予想以上に大きかったものの、接合伝達体の分取後 24 時間以内に転写プロファイルが大きく変化することが明らかとなった。本講演ではこの RNA-Seq 解析の結果を基に、プラスミドの接合伝達後に細胞内で何が起こっているのかを考察する。

Plasmid carriage requires appropriate expression of the genes on the plasmid or host chromosome through cooperative transcriptional regulation. Previously, we performed transcriptome analyses of plasmid-free and -harboring host strains to clarify the impact of plasmid carriage on the host chromosome (Shintani et al., 2010, EM, 12:1413-26; Takahashi et al., 2015, EM, 17:134-55). The plasmid-harboring strains used in these studies were cultured for a certain period after conjugation and “well-adapted” to plasmid carriage. Here, we used pBP136::*gfp* (Shintani et al., 2014, AEM, 80:138-45) to detect transconjugants immediately after conjugation by flow cytometry. RNA-Seq analyses were performed before and after cultivation of the transconjugants to clarify the adaptation process of the host *Pseudomonas* strains.

plasmid, flow cytometry, transcriptome

講演番号：2GS-06
講演日時、会場：3 月 19 日 17:05～ ミーティングルーム G

ESKAPE 病原細菌の薬剤耐性プラスミド
Plasmids associated with antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens

○鈴木 仁人 (国立感染研)
○Masato Suzuki (Nat. Inst. Infect. Dis.)

薬剤耐性 (AMR) の病原細菌による難治性感染症が国際的な公衆衛生上の問題となっている。世界に急速に拡散した多剤耐性グラム陰性菌には、抗菌スペクトルが広範で重篤な感染症の治療に用いられるカルバペネム系抗菌薬を含めて有効な抗菌薬が少ない。2014 年に英国政府の委託機関は、AMR 微生物感染症による死亡者は 2050 年までに世界で年間 1000 万人を超え、最も多い死亡要因になるという推測を行っており、WHO や世界各国は早急な AMR 対策を進めてきた。日本では、2016 年には日本国の”薬剤耐性 (AMR) アクションプラン 2016-2020”が策定され、国際的な協力体制の下にワンヘルス・アプローチの観点から AMR 対策を行ってきている。

臨床で AMR が問題となっている *Enterococcus* 属菌 (腸球菌)、*S. aureus* (黄色ブドウ球菌)、*K. pneumoniae* (肺炎桿菌)、*A. baumannii* (アシネトバクター・バウマニ)、*P. aeruginosa* (緑膿菌)、*E. coli* (大腸菌) を含む腸内細菌科細菌は”ESKAPE 細菌”と称されており、薬剤耐性遺伝子はしばしば伝達性プラスミドなどの可動性遺伝因子に媒介され、細菌-細菌間を伝播している。本演題では、我々が行っている国内外のヒト、動物、環境などから分離された ESKAPE 細菌を材料としたナノポアシークエンサーによる長鎖核酸解読技術を活かした薬剤耐性株のプラスミドの配列解析、Hi-C 法（染色体立体配座捕捉法）による染色体とプラスミドを分離したシングルセルメタゲノム解析、各菌種において AMR 遺伝子の獲得と関連したハイリスクなプラスミドの型別解析について紹介したい。

Antimicrobial resistance (AMR) genes are rapidly disseminated by mobile genetic elements, such as conjugative plasmids, among bacterial pathogens. *Enterococcus* spp., *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, and *E. coli*, in which widespread AMR has been serious problem, are referred to as "ESKAPE" bacteria. The following topics are mainly discussed in this talk: (1) plasmid analysis of AMR strains of ESKAPE pathogens isolated from humans, animals, and environment in Japan and other countries using the nanopore long-read sequencing technology; (2) single-cell metagenomic analysis using the Hi-C (chromosomal conformation capture) technology to separate chromosomes and plasmids in each bacterial cell; and (3) replicon typing analysis of high-risk plasmids associated with AMR genes in ESKAPE pathogens.

plasmid, AMR, ESKAPE pathogens

講演番号：2HS-01
講演日時、会場：3 月 19 日 15:05～ ミーティングルーム H

次世代放射光施設の概要
Overview of　the Next Generation Synchrotron Radiation Facility Project
○高田 昌樹（光科学イノベーションセンター）
○MASAKI TAKATA (Photon Science Innovation Center)

X 線を用いた計測・分析の概念が、2023 年の次世代放射光の登場によって大きく変わろうとしている。それは、放射光の輝度とコヒーレンス（可干渉性）が、世界最大の放射光施設 SPring-8 の性能を 100 倍上回ることによって実現される。この“未来の光”の性能は、実験室系 X 線分析の高輝度化、高分解能化という既存の放射光による連続的な進化にとどまらない。非連続的な技術革新となるコヒーレンスを活用した可視化(Visuality)で、“モノの見え方”を“ to see element”から”to see chemistry”へと変えてしまう。例えば、食品成分の体内動態、安全性や味・旨味、フリーズドライや冷凍などの品質管理・加工技術まで、ナノレベルでの化学状態マッピングで可視化されるようになる。この可視化が、放射光の専門家との垣根を取り払い、農芸化学とデータ科学との融合や、未踏領域の開拓を強力なツールとなる。2023 年完成予定の次世代放射光施設の農芸化学分野における可能性について概説する。

Of particular interest to Bioscience and Biotechnology as well as Agrochemistry is to visualize chemistry of the subject of interest in nanoscale via advanced Synchrotron Radiation. Next generation 3GeV Synchrotron Radiation Facility is under construction in the campus of Tohoku University at Sendai Japan. The facility shall allow to visualize such an advanced nano structural image via Scanning SAXS/XRD, Coherent diffractive imaging, Holography, Spectro-Ptychography, etc.. Future perspectives of in application of the new facility will be presented.

next generation synchrotron radiation facility, photon science, synchrotron radiation imaging

講演番号：2HS-02
講演日時、会場：3 月 19 日 15:25～ ミーティングルーム H

東北大学の取り組みと産学連携への活用

Efforts of Tohoku University and Activity for Enterprise Partnerships

○村松 淳司（東北大多元研）
○Atsushi Muramatsu (Tohoku Univ.)

地域パートナーシップの中での東北大学のミッションは，(1) 次世代放射光を活用した学術研究・産学連携の先導，(2) 産官学連携によるイノベーションシステムの構築，(3) 国際的な大学放射光アライアンスの形成，と，(4) 放射光施設を活かした人材育成であり，これらのミッションを遂行するための学内共同利用機関として，「国際放射光イノベーション・スマート研究センター，International Center for Synchrotron Radiation Innovation Smart」（以降，SRIS）が学内措置として，2019 年 10 月 1 日に設置された。これによって 2023 年の運用開始と共にスムーズな活用と成果創出を実現し，リサーチコンプレックス形成に貢献することが可能となる。SRIS の「スマートラボ」は、横幹、基幹、および展開の３つの部門から構成され，横幹研究部門は，ビームライン技術研究と次世代計測法開発、またそのインターフェース技術研究開発に関する R&D を推進する。基幹研究部門は，次世代計測技術の研究開発を推進する。展開研究部門は，社会連携研究、分野融合研究を推進する。このほか，一般財団　光科学イノベーションセンターとの共同研究部門「放射光次世代計測科学連携研究部門」が設置されている。この部門では，光科学イノベーションセンターが建設を推進するビームラインに係る業務との密接な連携の下，学術と産業における計測課題を共有し，新規の先端計測技術の提案や開発における学術研究を推進している。また，これらの先端計測が資する未踏課題の開拓と解決における先行実績を蓄積していくとともに，先端計測学の将来を担う幅広い学術的知見を有した人材の育成に貢献することが期待されている。また，SRIS は地域パートナー側のコアリションビームラインの運用面において，技術研究面での貢献をし，コアリションメンバーとの共同研究を推進する。

The mission of Tohoku University in the regional partnership is (1) leading academic research and industry-academia collaboration utilizing next-generation synchrotron radiation, (2) building an innovation system through industry-government-academia collaboration, (3) international universities and institutions alliance and (4) human resource development utilizing synchrotron radiation facilities. In order to carry out these missions, the "International Center for Synchrotron Radiation Innovation Smart (hereinafter SRIS) was established on October 1, 2019 as an on-campus measure. This will enable smooth utilization and result creation with the start of operation in 2023, and will contribute to the formation of a research complex.

Next generation synchrotron radiation facility, International center for SR Innovation Smart, Academia - Industry collaboration

講演番号：2HS-03
講演日時、会場：3 月 19 日 15:45～ ミーティングルーム H

農芸化学における次世代放射光のポテンシャル

Potential of the next-generation synchrotron radiation facility in bioscience, biotechnology, and agrochemistry

○原田 昌彦（東北大農）
○Masahiko Harata (Tohoku Univ.)

放射光はこれまでにも、X 線結晶解析による様々なタンパク質の立体構造決定やタンパク質工学への利用など、農学や生命科学の領域でも重要な役割を果たしてきた。現在、東北大学農学研究科に隣接して建設が進められている次世代放射光施設は、SPring-8 の 100 倍の明るさの軟 X 線が特徴の一つであり、タンパク質構造解析のみならず、軽い元素（C, N, O, Na, Mg, P, S）や遷移金属元素（Fe, Cu, Mn など）など、生体を構成する元素の分布や化学結合状態の可視化を可能とする。またコヒーレント光（光の波の山と谷がそろった光）も次世代放射光施設の特徴の一つであり、これにより生体や組織の微細構造の非破壊観察も可能となる。このようなポテンシャルは、農芸化学領域の研究を飛躍させ、産学連携を推進する大きな力となることが期待される。本講演では、東北大学大学院農学研究科での取り組みを例に挙げながら、農芸化学領域における次世代放射光施設とその利活用のポテンシャルについて紹介する。

In the fields of bioscience, biotechnology, and agrochemistry, synchrotron light has been mainly used for X-ray crystallography so far. The next-generation synchrotron radiation facility is now under construction in the Aobayama New Campus of Tohoku University, where the Graduate School of Agricultural Science is located. In addition to X-ray crystallography, this facility enables us to visualize light elements included in biological and agricultural specimens. Furthermore, using coherent X-ray provided by the facility, high-resolution imagings of non-disruptive samples can be achieved. In this talk, I will introduce the potential of the next-generation synchrotron facility in agricultural research and academic-industrial collaborations.

synchrotron light, agricultural research, academic-industrial collaboration

講演番号：2HS-04
講演日時、会場：3 月 19 日 16:00～ ミーティングルーム H

食・農分野でのフィージビリティスタディの紹介
Feasibility studies in the food and agriculture fields

○日高 將文（東北大農）
○Masafumi HIDAKA (Tohoku Univ.)

東北大学大学院農学研究科・農学部（以下、東北大農）は、食・農と放射光科学を融合した学術的研究の展開と産業利用促進を目指し、放射光を利活用する食・農研究のフィージビリティスタディに取り組んでいる。その一環として、企業と共同で申請した「仙台市既存放射光施設活用事例創出事業（トライアルユース事業）」に採択された 5 件の課題について、放射光測定を実施した。
実施例①：冷凍水産物組織内部の氷結晶を可視化することで最適な冷凍条件を見出すため、SPring-8 の BL14B2 で X 線 CT を測定し、冷凍水産物中の氷結晶構造評価を試みた。
実施例②：仙台産枝豆の成熟具合や食感の評価分析を目的として、SPring-8 の BL20B2 で位相差 X 線 CT を測定し、枝豆内部構造の可視化を試みた。枝豆内部の密度差に由来するコントラストを解析することで、枝豆の組織を非破壊・非染色で可視化することに成功した。また、ボイルによる内部の構造と密度の変化も可視化することができた。東北大農が有する様々な分析手法に放射光を利用した位相差 X 線 CT を融合することで、課題に対して多角的に検証することが可能となった。
本講演では、トライアルユース事業の取り組みを通して見出すことができた、産・学が持つ課題に対して、その解決のアプローチとして放射光を利活用することのポテンシャルを紹介したい。

Graduate School of Agricultural Science at Tohoku University is working on a feasibility study of food and agriculture research that utilizes synchrotron radiation with the aim of developing academic research and promoting industrial use. As part of feasibility study, synchrotron radiation measurements were carried out adopted in the "Sendai City Supported-Project for Creation of Existing Synchrotron Radiation Facilities Utilization Case (Trial Use Project)".
Example (1): In order to find the optimum freezing conditions by visualizing the ice crystals inside the frozen marine product structure, X-ray CT was measured with BL14B2 of SPring-8.
Example (2): In order to evaluate and analyze the maturity and texture of Edamame, phase-contrast X-ray CT was measured with BL20B2 of SPring-8. By analyzing the contrast derived from the density difference inside the edamame, we succeeded in non-destructive visualization of the edamame tissue.
In this lecture, I would like to introduce the potential of utilizing synchrotron radiation as an approach to solve the problems that companies and researchers have.

X-ray CT, synchrotron radiation, visualization

講演番号：2HS-05
講演日時、会場：3 月 19 日 16:15～ ミーティングルーム H

放射光を利用した食品の品質評価事例について

Evaluation of food quality by synchrotron radiation

○入江 謙太朗（日清製粉グループ本社）
○Kentaro Irie (Nisshin Seifun Group INC.)

筆者らは兵庫県の SPring-8 にて放射光を用いた食品の品質評価（X 線 CT、X 線回折）に取り組んだ。放射光を用いるメリットとして、X 線 CT については密度差の小さい氷と食材成分をコントラストよく識別して観察できること、X 線回折についてはきわめて短時間で分析が完了することが挙げられる。

X 線 CT による観察では、冷凍パスタの保管中の内部構造の変化を、二次元断層画像を得ることにより観察した。長期保管した冷凍パスタについて検討したところ、保管条件によってパスタ組織と氷結晶が相分離して氷結晶が大きくなるなどの凍結組織形態の変化が認められた。X 線回折による分析では、米飯の保管中の老化の評価を行い、並行して物性試験を行った。その結果、老化に伴って再結晶化した澱粉からの X 線回折プロファイルの変化と、物性測定の変化の挙動が連動していた。また低アミロース米のミルキークイーンでは澱粉の老化と物性変化が抑制されていた。

このようにして各食品の保管中の品質変化を把握することにより、今後食品の品質を維持するための技術の開発につなげたいと考えている。

We worked on food quality evaluation (X-ray CT, X-ray diffraction) using synchrotron radiation at SPring-8 in Hyogo prefecture. The merits of using synchrotron radiation are that X-ray CT can distinguish ice grains from food components with a small density difference with good contrast, and that X-ray diffraction analysis can be completed in an extremely short time.

In the observation by X-ray CT, changes in the internal structure of frozen pasta during storage were observed by obtaining 2D cross-sectional images. As a result of investigation on samples stored for one year under various environment, it was confirmed that the change of frozen texture, which exhibited phase separation of ice and the enlargement of ice grains, depended on the storage environment. In the analysis by X-ray diffraction, the retrogradation of cooked rice during storage was evaluated, and the mechanical property test was conducted in parallel. As a result, the change of X-ray diffraction profiles from recrystallized starch during storage correlated with the changes of mechanical property. In addition, in the Milky Queen with low amylose, retrogradation of starch was suppressed with little change in mechanical properties.

Thus, by grasping the quality change during storage of each food we would develop new technologies for maintaining the quality of foods.

SPring-8, X-ray CT, X-ray diffraction, frozen pasta, cooked rice, starch

講演番号：2HS-06
講演日時、会場：3 月 19 日 16:38～ ミーティングルーム H

土壌中の微量元素分析における放射光利用事例

Application of Synchrotron Radiation for Trace Elemental Analysis in Soil

○牧野 知之（東北大農）
○Tomoyuki Makino (Tohoku Univ.)

近年、コメのカドミウム(Cd)および無機ヒ素(iAs)含量の国際基準値が設定され、食の安全の観点から、水田土壌におけるこれら有害元素の動態解明と水稲の吸収抑制に関する研究が広く行われている。水田における湛水―落水は土壌の還元―酸化を生じ、Cd および iAs の形態と土壌中における固相−液相間の分配、すなわち水稲への可給性、に大きな影響を与える。湛水(還元)条件下で Cd は硫化カドミウムなどの難溶性化合物として不溶化するのに対し、iAs は主な吸着担体となっている土壌の(水)酸化鉄の還元溶解と吸着能の強いヒ酸から吸着能の弱い亜ヒ酸への形態変化により可溶化しやすい。放射光分析は土壌中の微量元素の形態分析に有効で、特に化学形態によって可給性が変化する Cd や iAs の動態解明には欠かせないツールである。本発表では、土壌中の微量元素分析における放射光利用事例として、水田土壌へのゼロ価鉄の施用によるアルセノパイライトの生成およびカドミウムの形態変化および水稲根圏におけるヒ素の存在形態に関する解析事例を紹介する。

In recent years, international standards have been set for cadmium (Cd) and inorganic arsenic (iAs) content in rice, and from the viewpoint of food safety, research on the dynamics of these toxic elements in paddy soils and the inhibition of their absorption by rice have been widely conducted. Flooding in paddy fields cause soil reduction and oxidation, which greatly affect the morphology of Cd and iAs and their partitioning between the solid and liquid phases in the soil, i.e., their availability to rice. Under waterlogged (reducing) conditions, Cd becomes insoluble as insoluble compounds such as cadmium sulfide, whereas iAs is easily solubilized due to the reductive dissolution of iron (hydro)oxide in the soil, which is the main adsorbent, and the morphological change from arsenate, which has a strong adsorption capacity, to arsenite, which has a weak adsorption capacity. Synchrotron radiation analysis is an effective tool for the morphological analysis of trace elements in soils, especially for elucidating the dynamics of Cd and iAs, whose solubility changes depending on their chemical forms. In this presentation, as examples of the use of synchrotron radiation for trace element analysis in soil, I will introduce the formation of Arsenopyrite and the morphological changes of Cd by the application of zero-valent iron to paddy soil, and the analysis of arsenic in the rhizosphere of paddy rice.

Paddy soil, Hazardous metal, Chemical speciation

講演番号：2HS-07
講演日時、会場：3 月 19 日 17:01～ ミーティングルーム H

Structure analysis of hemocyanin, a huge protein complex, using both X-ray crystallography and cryo-electron microscopy

○Yoshikazu Tanaka (Tohoku Univ.)

There are many protein complexes in which symmetrical part and asymmetrical part are co-existing. During structure analysis of them, structure of the asymmetric area is often misunderstood as if it has symmetry owing to the bias of symmetric parts. In this symposium, I would like to introduce an example to solve one of such protein complexes by combining X-ray crystallography and cryo-electron microscopy.

Hemocyanin is an oxygen transporter of mollusk. Squid hemocyanin is a homo decamer of 380 kDa subunits, which results in a huge cylindrical protein complex of 3.8 MDa. Each subunit is composed of 8 functional unit (FU) of 50 kDa. Six of them assembles to form wall region of the cylinder, whereas the remaining two form inner domains. We determined crystal structure of this huge protein complex by X-ray crystallography. The revealed structure showed clear density with D_5 symmetry in both wall and inner regions. However, there found 40 FUs inside although only 20 FUs should be located. Furthermore, electron density of the inner FUs were overlapped each other. Based on these observations, we, at that time, concluded that hemocyanin is composed of wall region with D_5 symmetry and five inner domains aligned with C_5 symmetry, and interminglement of two opposite orientations resulted in the D_5 symmetry. Later, in order to determine the structure of the inner region properly, we determined the same molecule by single particle analysis of cryo-electron microscopy. The revealed correct structure showed asymmetric inner arrangement surrounded by a cylindrical wall with D_5 symmetry. This study suggests an importance of combine electron microscopy and crystallography for tackle structure with complicated symmetries.

X-ray crystallography, cryo-EM, protein structure

講演番号：2IS-01
講演日時、会場：3 月 19 日 15:00～ ミーティングルーム I

気相中匂い物質の定量と動物行動に関する研究

The change of the gaseous concentration of chemosignals and mouse behavior.

○長田 和実、細野 朗（日本大生物資源）
○Kazumi Osada, Akira Hosono (Nihon Univ.)

近年、我々は匂い行動実験を実施する際に、GC-MS およびヘッドスペース－固相マイクロ抽出法（HS-SPME）を用いて気層中の揮発性物質の正確かつ経時的な定量を試みている。本シンポジウムでは気相中の匂い成分の濃度分布や継時変化を正確に測定し、マウスの嗅覚行動に詳細な解釈を加えた例を紹介したい。１）9 種類のオオカミカイロモン類縁体（アルキルピラジン類）の気相中濃度は物質により様々であったが、気相中濃度の高さ即ち蒸気圧の高さと忌避反応の間には正の相関は見られなかった。しかしながら、気相中濃度が経時的に上昇する物質ではマウスに対する忌避作用が強いことが示唆された。２）食品の香辛料などに由来する香気成分は食塩摂取量の修飾作用があることが示唆されているが、動物実験を用いた直接証拠は散見するに過ぎない。本研究では常法により継続的に匂い成分がするようなにおい提示条件を検討したのちに、二瓶選択法を用いて C57BL/6j マウスに対する水と 0.15 M NaCl 水溶液の 24 時間の摂取率を計測し食品中におい成分のナトリウム摂取調節作用を検討した。３）さらに食肉加工品および加工時の匂いと消化管免疫機能の関連を明らかにするために、食肉加工時のにおいをアセトン蒸留で洗浄した木綿布に吸着させ、BALB/c マウスを飼育しているケージにかぶせ、ケージ内のにおい物質が均一に分布していることを確認したのち、1 日 1 時間（0, 1, 3, 5 日間）マウスに提示し、腸管免疫系細胞応答に対する影響を検討した。

We developed a rapid and accurate method for quantifying gaseous phase odorants using headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) in conjunction with GC-MS and used our system to quantify alkylpyrazine analogs in the Y-maze and mice polycarbonate cage. Rapid extraction of volatile compounds in the vapor phase achieved quick and accurate quantitative analysis of gaseous chemicals at several locations in these experimental apparatuses. Next, we conducted a behavioral test of mice in response to these alkylpyrazines and identified a positive relationship between the rate of increase in gaseous concentration and the avoidance rate induced. the time-dependent increase of alkylpyrazine concentration is correlated with induction of aversive behavior in mice. In addition, we addressed to clarify the effect of atmospheric food odorants to the preference of 0.15 M NaCl solution using two-bottle choice test. In addition, we also explore the nature of food odorants inducing immune responses in the murine gut immunity. In this symposium, we herein demonstrate above mentioned results.

volatile concentration, mouse behavior, avoidance

講演番号：2IS-02
講演日時、会場：3 月 19 日 15:25～ ミーティングルーム I

マウスにおける２つの嗅覚系を介した天敵臭ピラジン化合物刺激に対する恐怖反応の制御

Parallel detection and processing of predator odor, pyrazine analogs, via main olfactory and vomeronasal systems in mice

○宮園 貞治[1]、野口 智弘[1]、笹島 仁[1]、長田 和実[2] ([1]旭川医大、[2]日本大生物資源科学)
○ Sadaharu MIYAZONO[1], Tomohiro NOGUCHI[1], Hitoshi SASAJIMA[1], Kazumi OSADA[2] ([1]Asahikawa Med. Univ., [2]Nihon Univ., Col. of Bioresource Sciences)

動物が生存していく上で、危険に対して恐怖を感じて適切に対応することは重要である。マウスなどの被食動物は天敵の匂いを嗅ぐと恐怖反応を示す。恐怖反応には、行動の変化のみならず、内分泌系や自律神経系の変化をも伴う。このような恐怖反応は、主嗅覚系と鋤鼻系の２つの嗅覚系によって制御されると予想されるが、その詳細については不明な点が多い。我々がオオカミの尿中から見出した揮発性物質ピラジン化合物もマウスに恐怖反応を誘発する。このピラジン化合物は両方の嗅覚系を刺激する初めての恐怖誘発物質である。この物質を用いて、恐怖反応の誘発における各嗅覚系の役割を調べるために、片方の嗅覚系を阻害したマウスを準備し、それぞれのマウスが示す恐怖反応を比較した。その結果、内分泌系変化は、いずれか片方の嗅覚系を阻害しても維持された。また、自律神経系変化は、主嗅覚系を阻害しても維持されたが、鋤鼻系の阻害により消失した。一方、行動の変化は、その種類により様々な特性が観察された。さらに、脳内神経活性について調べたところ、扁桃体や視床下部において各嗅覚系依存的な神経活性が見られた。以上のことから、２つの嗅覚系は恐怖反応の誘発の際に異なる役割を担っており、両方の嗅覚系を介して様々な恐怖反応が正常に引き起されることが示唆された。

When prey animals detect predator odor, a spectrum of fear-related behavioral, autonomic and endocrine responses innately occur to promote survival. How olfactory systems process predator odor to induce the responses is not clearly understood. Our previous study identified a couple of pyrazine analogs from wolf urine as a novel fear-eliciting odor. The pyrazine-analogs mixture induces the fear responses in laboratory mice which possess two major olfactory systems, the main olfactory system (MOS) and the vomeronasal system (VNS). Here, we investigate how the two olfactory systems contribute to induction of the fear responses. For this purpose, we interfered with the murine two olfactory systems either independently or simultaneously. The results suggest that the MOS and VNS could process the odor of a predator either in collaboration or independently to induce a set of the fear-related responses.

olfactory, fear, pyrazine

講演番号：2IS-03
講演日時、会場：3 月 19 日 15:50～ ミーティングルーム I

芳香族炭化水素受容体を介したインドールによる抗炎症作用

Anti-inflammatory effect of indole via aryl hydrocarbon receptor

○白川 仁[1]、Islam Jahidul[1]、Agista Afifah Zahra[1]、鈴木 玲[1]、大崎 雄介[1]、小関 卓也[2]、駒井 三千夫[1] ([1]東北大・院農、[2]山形大・農)
○Hitoshi Shirakawa[1], Jahidul Islam[1], Afifah Zahra Agista[1], Rei Suzuki[1], Yusuke Ohsaki[1], Takuya Koseki[2], Michio Komai[1] ([1]Grad. Sch. Agri. Sci., Tohoku Univ., [2]Fac. Agri., Yamagata Univ.)

トリプトファン代謝物のインドールは、スカトール（3 メチルインドール）とともに、糞便中の主要な臭い成分である。大腸菌をはじめ多くの腸内細菌がトリプトファナーゼによりトリプトファンをインドールへと代謝する。インドールは、細菌間のシグナル伝達分子としてはたらき、プラスミドの安定性、薬剤耐性、バイオフィルム形成、病原性などに関与する。一方、動物へ取り込まれたインドールは、芳香族炭化水素受容体（aryl hydrocarbon receptor: AHR）のリガンドとして機能する。AHR は環境汚染物質であるダイオキシン類の毒性を仲介する因子として発見された受容体型転写調節因子である。リガンドが結合した AHR は DNA 上の異物応答配列に結合し、CYP1A1 をはじめとした薬物代謝酵素遺伝子の発現を調節する。AHR は生体異物の代謝、排泄に加えて、発生、器官形成、免疫調節など、多くの機能と関連していることが明らかにされている。一方、内因性のリガンドを探索した結果，インドールをはじめとしたトリプトファン代謝物が AHR のリガンドとして機能することが示されており、腸内細菌由来のインドールも AHR を介して、宿主の生理状態に影響を与えている。我々、DSS 誘発大腸炎モデルにおいて、高トリプトファン食が AHR を介して大腸炎の発症を抑制することを示した。インドールなどのトリプトファン代謝物は AHR を活性化させ、抗炎症作用を示すと推定された。

Indole, one of tryptophan metabolites, is a major odorous ingredient in feces as well as skatole (3-methylindole). Many intestinal microorganisms including *E. coli*, metabolize tryptophan to indole by their tryptophanase. Indole acts as an intercellular signaling molecule and is involved in plasmid stability, drug resistance, biofilm formation, and pathogenicity. In animals, absorbed indole functions as a ligand for aryl hydrocarbon receptor (AHR). AHR is a transcriptional regulator discovered as a factor that mediates the toxicity of environmental pollutant dioxins. AHR modulates the expression of genes including CYP1A1 and other drug metabolic enzymes for the metabolism and detoxification of xenobiotics. And AHR is also involved in development, organogenesis, and immune function. The investigations of endogenous ligands of AHR revealed that tryptophan metabolites including indole can work as the ligand of AHR and modulate gene expression. We showed that tryptophan supplemented diet can suppresses the symptom of colitis in DSS-induced colitis model via AHR. These results indicated that indole and other tryptophan metabolites activate AHR and suppress inflammation.

indole, aryl hydrocarbon receptor, anti-inflammation

講演番号：2IS-04
講演日時、会場：3 月 19 日 16:15～ ミーティングルーム I

腸内細菌から産生される揮発性尿毒素の臨床的意義

Volatile uremic substances from gut microbita and its clinical relevances

○脇野 修[1]、内山 清貴[1]、吉藤 歩[2]、伊藤 裕[1] ([1]慶應義塾大学医学部、[2]東京済生会中央病院)
○Shu Wakino[1], Kiyotaka Uchiyama[1], Ayumi Yoshifuji[2], Hiroshi Itoh[1] ([1]Department of Medicine, Keio University, [2]Saiseikai Central Hospital)

腸管内には100兆～1000兆個の腸内細菌が生息し腸内細菌叢を形成している。腸管ではこの腸内細菌が様々な不揮発性物質を産生し、一部体内へ吸収されている。腎不全では腸内細菌叢の分布の変化が認められ、腸管由来の尿毒素の前駆体の産生が亢進する。特に重要なものがインドール、pークレゾール、トリメチルアミンである。インドール、pークレゾールであり、食事成分として摂取したトリプトファン，チロシン，L-カルニチンとコリンがそれぞれインドール，*p*-クレゾール,トリメチルアミン（TMA）へと変化する。これらの物質は全身循環から移行して肝臓において代謝を受けることでそれぞれインドキシル硫酸，*p*-クレシル硫酸，TMAO と変化する。インドール、p-クレゾールは芳香族炭化水素受容体（aryl hydrocarbon receptor：AhR）を介して腸管に直接作用する。インドールは腸管のバリア機能に関与することが知られ、これが体内に侵入し、インドキシル硫酸へと変換され心血管組織の酸化ストレスを負荷する。インドキシル硫酸にはAhR を介して中枢神経系の炎症抑制作用もある。*p*-クレゾールには腸内細菌の殺菌，増殖抑制作用があり腸管内の望ましくない菌の増殖を防ぐことで細菌叢の恒常性を維持する一方、腎不全で認められる、腸内細菌数自体の減少に関与している可能性も考えられる。腸内細菌が産生する揮発物質は慢性腎不全の病態に影響を与えており、それらの産生を抑えること、すなわち腸内細菌の変化を是正する治療法が試されている。

The microbiota in healthy human intestines is a complex community of more than 100 trillion microbial cells among which are more than 1000 different species. In the healthy state, these microbes live in a commensal relationship with their host, modulating the immune system, protecting against pathogens, and regulating endogenous metabolism of carbohydrates and lipids, thus contributing to the nutritional balance. The alterations in the microbiome are linked to the pathogenesis of various diseases such as obesity, cancer, diabetes, and kidney disease. Alteration of the population of microbiota, dysbiosis is often observed in uremic states characteristic of retention of uremic toxins, most of which derive from the imbalanced fermentation of nitrogen metabolites. These includes indol, P-cresol, and trimethylamine (TMO) and derived from tryptophan, tyrosine, and l-carnitine and choline respectively which contained in the food. The overproduction and retention of these volatile uremic toxins contribute to the progression and complications of chronic renal failure. The ameliorations of these imbalances of microbiota population through probiotics, prebiotics or synbiotics have been the target of the treatment of chronic renal failure.

Uremic dysbiosis, Uremic toxin, Chronic renal failure

講演番号：2IS-05
講演日時、会場：3 月 19 日 16:40～ ミーティングルーム I

メイラード反応生成香気成分 DMHF の香気刺激によって誘発される生理作用

Physiological functions induced by the odor stimulation of DMHF generated from the Maillard reaction

○大畑 素子[1]、横山 壱成[2]、矢田 幸博[3]、有原 圭三[2] ([1]日本大学生物資源科学部、[2]北里大学大学院獣医学系研究科、[3]筑波大学大学院グローバル教育院)
○Motoko Ohata[1], Issei Yokoyama[2], Yukihiro Yada[3], Keizo Arihara[2] ([1]Nihon Univ., [2]Kitasato Univ., [3]Tsukuba Univ.)

食品におけるメイラード反応は、アミノ酸やペプチド、タンパク質などのアミノ化合物と還元糖などのカルボニル化合物が関わって起こる。この反応により様々な香気成分が生成し、食品の品質や嗜好性に大きな影響を及ぼす。2,5-Dimethyl-4-hydroxy-3(2*H*)-furanone（DMHF と略す）は、甘いキャラメル様の香調を呈し、メイラード反応によって生成される非常に代表的な香気成分である。演者らはこれまでに、DMHF をラットに曝露した際、腎臓交感神経活動が抑制され胃迷走神経活動が亢進し、血圧が低下することで生体が鎮静化することを報告してきた。さらに近年、ヒトにおける DMHF の生理作用も明らかにしている。DMHF の吸入によって、ヒトの末梢皮膚温および瞳孔の縮瞳率が有意に上昇し、交感神経活動の抑制および副交感神経活動の亢進が誘発されることを明らかにした。また、近赤外光脳機能イメージングで、DMHF の吸入による前頭前野の酸素化ヘモグロビン濃度の有意な減少を確認し、大脳活動が鎮静化することも示した。これらの生理応答に関連する主観的な気分や感情の変化を評価したところ、DMHF の吸入により敵意の感情や疲労感、緊張感などの陰性感情が有意に軽減しており、生体が鎮静化することでこのような気分に影響したと考えられた。DMHF は、抗酸化活性や抗菌作用などの保健的機能性がいくつか報告されているが、香気吸入による生体への影響については演者らの研究によって初めて示された作用である。本シンポジウムでは、ラットにおける生理作用を交えながら、DMHF の香気刺激によるヒトでの生理応答を中心に演者らの最近の研究成果を紹介する。

The Maillard reaction is a non−enzymatic browning reaction between the amino compounds and carbonyl compounds in foods. This reaction produces hundreds of low−molecular−weight odorants that play an important role in forming the characteristic flavor of processed food. 2,5−Dimethyl−4−hydroxy−3(2*H*)−furanone (DMHF), which has a sweet caramel−like odor, is one of the most typical odorants generated by the Maillard reaction in foods. Previously, we have reported that DMHF decreases blood pressure in rats by suppressing the activity of the sympathetic nervous system and thereby induces a sedative effect. Moreover, in humans, DMHF appears to reduce the moods of hostility, fatigue, and tension. Inhalation of DMHF affects the autonomic and central nervous systems and can induce physical relaxation. In this symposium, we present a summary of our novel findings.

DMHF, The Maillard reaction, Sedative effect

講演番号：2IS-06
講演日時、会場：3 月 19 日 17:05～ ミーティングルーム I

人における匂いの影響

Effects of odors on human behavior and cognition.

○坂井 信之（東北大文）
○Nobuyuki Sakai (Tohoku Univ.)

この話題提供では、嗅覚がヒトの行動や思考にどのような影響を与えるかということについて、認知神経科学や心理学の分野で報告されている知見を紹介する。食物を味わっている時に感じる感覚を我々は「味」と呼ぶが、この「味」に味覚が関与する割合は少なく、その多くは嗅覚に依存している。しかしながら、嗅覚は影の立役者に徹し、我々の意識は口から味がするように感じるようになっている。この現象については研究が進みよく理解されるようになっているので、このメカニズムについての知見も含めて紹介したい。

また、嗅覚は人の対人印象にも大きな影響を与える。香水やシャンプー、柔軟剤などの香りによって、他人に与える印象が異なることに関する現象論的な実験についても説明する。さらに、部屋に漂っている香りによって人の認知に影響が生じること（例：魚の匂いがすると、疑い深くなる）、甘い香りが漂う環境では人は他人に親切になること、店舗の香りが消費者の購買行動に影響を与えることなどについても紹介する。

最後に、人においてもフェロモンに類する仕組みが存在することがいくつかの研究によって示唆されているので、それらについても紹介したい。

In this talk, some knowledge about olfactory effects on our behavior and/or cognitive function will be introduced. For this topic, the famous example is “Taste”. We feel “Taste” during eating and drinking, but this “Taste” is not based on gustatory sensation, but on multimodal perception constituted mainly by olfactory sensation. This phenomenon is very famous and well-studied, thus there are many studies aiming to reveal the mechanisms underlying this phenomenon.

Then some studies about powers of olfaction in social and cognitive psychology are introduced. The aromas of perfume, shampoos and fabric softeners have impacts on social perception of human. The aromas also affect human helping behavior, consuming behavior and problem solving.

At last, some studies suggesting odors have pheromone-like function in humans will be introduced.

olfaction, taste, human behavior

講演番号：3AS-01
講演日時、会場：3 月 20 日 15:00～ ミーティングルーム A

Effect of helicase addition on quality of DNA amplification

○Shinsuke Fujiwara (Kwansei-Gakuin Univ.)

DNA amplification such as PCR or isothermal method is generally used to make millions of copies of a specific DNA target. Unexpected DNAs (noise) sometimes appear due to primer mis-annealing in the amplification process. In diagnosis, monitoring of hereditary diseases or virus infection detection including COVID-19, mis-amplification leads to serious mis-judgement. To avoid this problem, various approaches such as optimization of the annealing temperature and Mg^{2+} concentration, and hot start approaches were attempted. In this symposium, I will introduce an approach by DNA/RNA helicase to eliminate noise signals in DNA amplification.

DNA/RNA helicases, which catalyze the unwinding of duplex nucleic acids using the energy of ATP hydrolysis, contribute to various biological functions involving DNA or RNA. In the present study, two kinds of helicases (superfamily 1B and 2) were focused and their effect on PCR was examined. Euryarchaeota-specific helicase *Tk*-EshA (superfamily 2) from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakarensis* unwound forked and 3’ overhung DNAs. In the presence of *Tk*-EshA, noise DNAs were reduced when *Taq* DNA polymerase (a family A DNA polymerase, PolI type) or KOD DNA polymerase (a family B DNA polymerase, α type) was applied for PCR (1). Noise reduction was remarkable for *toxA* amplification from *Pseudomonas aeruginosa* DNA which possesses a high GC content (69%). Another type (superfamily 1B) of helicase *Tk*-Upf1 from *T. kodakarensis*, which has the unwinding activity toward 5' overhung DNAs, was also examined for its effectiveness in PCR. Noise DNAs were eliminated in the presence of *Tk*-Upf1 at concentrations 10-fold lower than those required to yield a comparable reduction with *Tk*-EshA. When a 5' or 3' overhung mis-annealed primer was included as a competitive primer along with specific primers, noise DNAs derived from the mis-annealed primer were eliminated in the presence of *Tk*-Upf1 as well as *Tk*-EshA. In digital PCR, addition of *Tk*-EshA or *Tk*-Upf1 increased signal intensities and improved separation between common and risk allele clusters (2). Both helicases functioned as signal enhancers in digital PCR. In comparison with *Tk*-EshA, a smaller amount of *Tk*-Upf1 was enough to improve the performance of digital PCR. As introduced above, helicase would be a useful additive to reduce noise DNAs in PCR.

(1) Fujiwara et al.: Appl. Environ. Microbiol. 82: 3022 (2016)
(2) Hidese et al.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 495: 2189 (2018)

archaea, helicase, PCR

講演番号：3AS-02
講演日時、会場：3 月 20 日 15:23～ ミーティングルーム A

Development of recombinase and single-stranded DNA-binding protein for the RPA method and optimization of the reaction conditions

○Kenji KOJIMA (Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.)

Recombinase polymerase amplification (RPA) amplifies a target nucleic acid sequence at a constant temperature near 40℃ with a recombinase enzyme, a single-stranded DNA-binding protein (SSB), and a strand-displacing polymerase. In RPA, recombinase binds to the primers, and the primers of the resulting complex bind to the homologous sequences of the DNA template. Strand-displacing DNA polymerase extends the primer while SSB binds to the unwound strand. By using two opposite primers, the target sequence is amplified exponentially. One of the merits of RPA over PCR is that RPA has the potential to eliminate the use of specialized equipment to provide the required temperature. Thus, RPA is more suitable for point-of-care use than PCR. Indeed, most papers on RPA published to date have highlighted the importance of RPA for point-of-care use, with many RPA targets being pathogenic organisms. In addition, technologies for DNA extraction and amplicon detection that have been combined with RPA are moving increasingly closer to a true implementation at the point-of-care. Currently, the only way to perform RPA is to use Twist's commercially available kit, which makes it difficult to optimize the reaction conditions for each target nucleic acid. Therefore, we prepared the major proteins used in RPA in house and attempted to perform RPA using them. We prepared uvsX, a recombinase from T4 phage, uvsY, a protein which assists the function of uvsX, and gp32, a single-stranded DNA-binding protein, and successfully performed RPA reactions using them. The optimal temperature, pH, and CH_3COOK concentration for the RPA reaction were then investigated. Since the initial reaction conditions under which we successfully performed the RPA reaction resulted in a very slow nucleic acid amplification rate, we are now using statistical methods (Taguchi method) to optimize the RPA reaction conditions and steadily improve the nucleic acid amplification rate.

【Reference】

Kojima K, Juma KM, Akagi S, Hayashi K, Takita T, O'Sullivan CK, Fujiwara S, Nakura Y, Yanagihara I, Yasukawa K. Solvent engineering studies on recombinase polymerase amplification. J. Biosci. Bioeng. in press

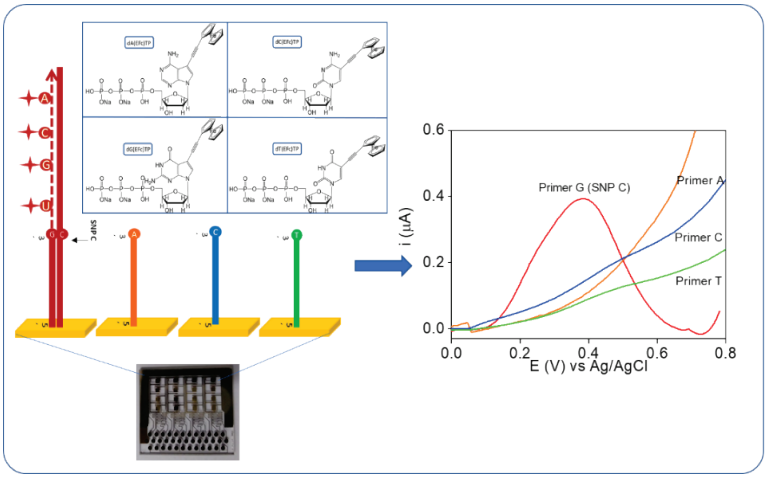
recombinase polymerase amplification, Taguchi method, nucleic acid amplification

講演番号：3AS-03
講演日時、会場：3 月 20 日 15:46～ ミーティングルーム A

Multiplexed detection of single nucleotide polymorphisms via solid-phase primer elongation with ferrocene labelled nucleotides

Mayreli Ortiz[1], Anna Simonova[2,3], Vasoula Skouridou[4], Michal Hocek[2,3], Ioannis Katakis[1], ○O'Sullivan Ciara K.[1,3] ([1]Departament d'Enginyeria Química, Universitat Rovira i Virgili, Avinguda Països Catalans 26, 43007 Tarragona, Spain、[2]Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Czech Academy of Sciences, Flemingovo nam.2, 16610 Prague 6, Czech Republic、[3]Department of Organic Chemistry, Faculty of Science, Charles University, Hlavova 8, 12843 Prague 2, Czech Republic、[4]Institució Catalana de Recerca i Estudis Avançats, Passeig Lluis Companys 23, 08010 Barcelona, Spain Institució Catalana de Recerca i Estudis Avançats)

An approach for the multiplexed detection and identification of single nucleotide polymorphisms exploiting electrode arrays, primer elongation and ferrocene labelled nucleotides is presented. Solid-phase isothermal primer elongation reaction using ferrocene-labelled 2'-deoxyribonucleoside triphosphates (Fc-dNTPs) was exploited for the electrochemical detection of a single nucleotide polymorphism (SNP). Four 5'-thiolated primers, designed to be complementary with the same fragment of the target sequence and differing only in the last base at the 3-OH' end, were self-assembled with 6-mercaptohexanol on individual gold electrodes of an array. Solid phase isothermal primer elongation using recombinase polymerase amplification (double stranded DNA target) for 15 minutes at 37ºC and using an optimised ratio of Fc-dNTPs and natural dNTPs. Square wave voltammetry was used to measure the ferrocene present in the elongated primers. Elongation only occurred with the primer containing the base complementary to the single nucleotide polymorphisms present, with an unequivocal electrochemical signal observed. The platform was applied to the multiplexed detection of SNPs associated with osteoporosis using genomic DNA from a fingerprick blood sample, as well as to the detection of SNPs linked with resistance to the antibiotic rifampicin in *Mycobacterium tuberculosis* again using genomic DNA. Results were validated using next generation sequencing. This generic platform was developed as a proof-of-concept for the detection of an individual SNP, and work is ongoing to extend the platform for the multiplexed detection of SNPs, with a plethora of potential applications in clinical diagnostics, detection of antibiotic resistance and forensics.



single nucleotide polymorphisms, ferrocene, recombinase polymerase amplification

講演番号：3AS-04
講演日時、会場：3 月 20 日 16:10～ ミーティングルーム A

The simplicity of electrophoresis and electrochemical sensor for field-applicable analysis of isothermal RNA/DNA amplification reactions

○Manish Biyani[1], Kiyoshi Yasukawa[2] ([1]BioSeeds, [2]Kyoto Univ.)

The recombinase polymerase amplification (RPA)-based isothermal nucleic acid amplification strategy is one of the most rapidly developing methods for performing nucleic acid tests outside laboratory settings. However, the reaction mechanism of RPA at low temperature operation results in unavoidable concerns related to nonspecific and off-target binding of the recombinase enzyme that lead to false-positive results, and thus successful RPA signal detection outside the laboratory has yet to be demonstrated. Here, we developed portable one-inch gel electrophoresis system and disposable electrochemical printed sensor (DEPSOR) for simple and reliable analysis of RPA products to discriminate true-positive results from false-positive and/or negative results generated during the RPA reaction. This talk will highlights: First, the applicability of RPA in combination with palm-size electrophoresis for the detection of 18S rRNA gene analysis of cutaneous leishmaniasis near-to-patient [Anal Methods 2019]. Second, the applicability of RPA in combination with DEPSOR for the quantitative detection of bacteria (*Escherichia coli*) and viruses (SARS-CoV-2). Our 'sample-to-results in minutes' protocol demonstrated that the combination of robust RPA with portable electrophoretic and/or electrochemical devices can revolutionize nucleic acid-based molecular diagnostics for people in settings with poor healthcare infrastructure.

electrochemical sensor, recombinase polymerase amplification, RNA/DNA amplification

講演番号：3AS-05
講演日時、会場：3 月 20 日 16:33～ ミーティングルーム A

Molecular diagnostic tests of COVID-19

○Itaru Yanagihara[1], Yoshitaka Tamura[1], Yuichiro Oba[1], Muneyuki Takeuchi[1], Shinobu Ida[1], Yukiko Nakura[1], Koichiro Suzuki[2], Shinsuke Fujiwara[3], Kiyoshi Yasukawa[4] ([1]Osaka Pref. Hosp. Org., [2]Res. Found. Microbial. Dis. Osaka Univ., [3]Kwansei-Gakuin Univ., [4]Kyoto Univ.)

Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) was identified and ravaging the globe. Since its first report in December 2019, COVID-19 cases have explored to over 72 million and exceeded more than 1.6 million deaths as of Dec 2020. The ability of clinical diagnostic testing is critical for reducing and regulating the COVID-19 pandemic.

To date, molecular biological nucleic amplification methods and immunological diagnostic procedures are commonly used for SARS-CoV-2 detection. FDA authorized 298 tests and sample collection devices under EUAs (Emergency Use Authorizations), including 229 molecular tests and sample collection devices, 61 antibody tests, and 8 antigen tests (FDA NEWS RELEASE, UPDATE December 10, 2020). In Japan, One-step real-time quantitative reverse transcription PCR (One-step RT-qPCR) and Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) methods are mainly used for molecular diagnosis. RT-qPCR is highly reliable because it is a quantitative method (detection limit ~5 copy/test) suitable for evaluating the viral copy number trends. The LAMP method is a gene detection method that can be carried out at a constant temperature and implemented with simple equipment. Although the sensitivity is lower than that of real-time PCR, it is within the practical range and has the advantage of a short reaction time of about 35~50 minutes. A qualitative antigen test is a method to detect viral antigens, and a negative result is a definite diagnosis in cases with 2-9 days of onset. It is a rapid and straightforward POC and is useful for screening symptomatic patients in outpatient and bedside settings.

On the other hand, quantitative antigen testing can measure the amount of viral antigen. It has high specificity and sensitivity at the same level as simple genetic testing methods such as the LAMP method. The antibody test is known to be positive 1-3 weeks after the onset of symptoms and is used as an indicator of infection history. We will also discuss the attempts for SARS-CoV-2 molecular diagnosis in Osaka.

Covid-19, Nucleic acid amplification

講演番号：3AS-06
講演日時、会場：3 月 20 日 16:56～ ミーティングルーム A

Alteration of enzymes and their application to nucleic acid amplification

○Kiyoshi Yasukawa (Kyoto Univ.)

Since the discovery of polymerase chain reaction (PCR) in 1985, several methods have been developed to achieve nucleic acid amplification, and are currently used in various fields including clinical diagnosis and life science research. Thus, a wealth of information has accumulated regarding nucleic acid-related enzymes. In this review, some nucleic acid-related enzymes were selected and the recent advances in their modification along with their application to nucleic acid amplification were described. The discussion also focused on optimization of the corresponding reaction conditions. Using newly developed enzymes under well-optimized reaction conditions, the sensitivity, specificity, and fidelity of nucleic acid tests can be improved successfully.

Despite being a widespread analytical method both in fundamental research and clinical diagnosis, there are limitations in nucleic acid amplification, which are represented by false-positive and false-negative results. Many efforts are still being devoted to improve the sensitivity, specificity, rapidness, and accuracy of nucleic acid amplification. The catalytic mechanism of nucleic acid-related enzymes has been extensively investigated by means of X-ray crystallography, kinetic analysis, and site-directed mutagenesis, leading to the generation of enzymes exhibiting extremely high activity and stability. Such enzymes and optimized reaction conditions offer many advantages that can be expected to enhance the efficiency of nucleic acid amplification tests, which may meet the increasing demand of point-of-care diagnosis both in developed and developing countries.

In this symposium, I will outline recent advances in nucleic acid amplification technologies. The foci of the study are, reverse transcriptase as an example of an enzyme that has been markedly improved by genetic engineering; recombination polymerase amplification, an isothermal amplification which has attracted a great deal of recent attention, and next-generation sequencing (NGS) which was used to evaluate the fidelity of cDNA synthesis; and the statistical method to optimize the reaction conditions.[1]

1. Yasukawa, K., Yanagihara, I., and Fujiwara, S.: Alteration of enzymes and their application to nucleic acid amplification (Review). *Int. J. Mol. Med.* **46**: 1633-1643, 2020

enzyme, nucleic acid amplification, fidelity

講演番号：3BS-01
講演日時、会場：3 月 20 日 15:00～ ミーティングルーム B

大腸菌の増殖を促進する金属タンパク質 SodCII の活性化メカニズム

Activation of a metalloprotein SodCII as an enzyme facilitates proliferation of *Escherichia coli*

○古川 良明（慶大理工）
○Yoshiaki Furukawa (Keio Univ.)

銅・亜鉛スーパーオキシドディスムターゼ（SodC）は、銅イオンと亜鉛イオンを結合することでスーパーオキシド（O_2^-）の不均化を促進する抗酸化酵素である。グラム陰性菌では、ペリプラズム空間に SodC が局在しており、好中球によって貪食される際に発せられる O_2^-から菌を保護する役割が考えられている。実際、病原性サルモネラ菌には二種類の SodC が存在し（SodCI, SodCII）、SodCI を欠損させることで好中球に貪食され病原性を喪失することが知られている。一方で、SodCII を欠損させたサルモネラ菌の病原性には変化がなかったことから、その役割については未だ明確となっていない。SodCII の発現は増殖定常期に特異的なシグマ因子（σ38）によって制御されていることから、ストレス環境下での生育に必要ではないかと予想されるものの、SodCII を欠損させても菌の生育には大きな差異が生じないことが報告されている。本発表では、SodCII が O_2^-を除去する酵素活性を発現するために必要となる銅・亜鉛イオンを獲得するメカニズムについて考察するとともに、ペリプラズム空間における SodCII の酵素活性がバクテリアの増殖を促進するメカニズムについて発表する。

Cu/Zn-superoxide dismutase (SodC) constitutes an antioxidant defense system by facilitating the dismutation of superoxide radicals in bacterial cells. Several pathological bacteria such as *S. enterica* are equipped with two types of SodC (*i.e.* SodCI and SodCII) in their periplasmic space. It is proposed that a role of SodCI in bacteria is to combat against oxidative burst from a host cell during infection; however, physiological significance of SodCII has not been recognized. Indeed, deletion of the gene coding SodCII from bacteria such as *E. coli* and *S. enterica* has been proposed to affect neither their infectivity to host nor their proliferation. Here, I will show our recent results that in non-pathogenic *E. coli*, the enzymatic activation of SodCII in the periplasmic space did accelerate the bacterial proliferation. The enzymatic activity of periplasmic SodCII protects bacterial cells from oxidative insults and thus facilitates the proliferation under aerobic environment. A mechanism acquiring copper and zinc ions by SodCII, which are essential for the enzymatic activity, will be also discussed.

copper ion, reactive oxygen species, metalloprotein

講演番号：3BS-02
講演日時、会場：3 月 20 日 15:25～ ミーティングルーム B

NiFe 型ヒドロゲナーゼの活性中心形成に必要な CO 生合成反応の分子機構

Molecular mechanism of CO biosynthesis required to assemble the active site in NiFe-hydrogenase

○青野 重利（自然科学研究機構）
○Shigetoshi Aono (NINS)

水素ガスの酸化反応・プロトンの還元反応を触媒する酵素であるヒドロゲナーゼは、バクテリアなどによる水素代謝において中心的な役割を果たしている他、最近では燃料電池用触媒としての利用も期待されている金属酵素である。活性中心の構造の違いにより、[NiFe]型、[FeFe]型、[Fe]型の３種のヒドロゲナーゼが存在するが、いずれの場合も活性中心の Fe には、CO が配位している。この CO は、酵素反応により生合成されることが分かっているが、CO 生成反応の分子機構は不明な状況であった。本研究では、[NiFe]型ヒドロゲナーゼが利用している CO の生合成に関わる酵素（HypX）の結晶構造を決定し、HypX がこれまでに全く例の無い反応により CO を合成していることを明らかにした。HypX は二つのドメイン（N 末ドメインと C 末ドメイン）から構成されており、分子内部にはこれら二つのドメインにまたがる形でキャビティーが存在している。また、C 末ドメイン側のキャビティーには、補酵素 A（coenzyme A: CoA）が結合していることが分かった。得られた結晶構造を基に、下記のような CO 生合成反応機構を提唱した。HypX の N 末ドメインと C 末ドメインでは、それぞれ異なる二つの化学反応が進行する。N 末ドメインでは、反応基質として N 末ドメイン中のキャビティーに結合したホルミルテトラヒドロ葉酸から CoA へのホルミル基転移反応が進行する。この時、キャビティー中の CoA は直鎖状に伸びたコンフォメーションを取り、CoA の末端にある-SH 基は N 末ドメインに結合したホルミルテトラヒドロ葉酸中のホルミル基の側に位置し、CoA へのホルミル基転移反応によりホルミル-CoA が反応中間体として生成する。生成したホルミル-CoA は、CoA 分子の末端部分に存在するホルミル基が、HypX の C 末ドメイン中の酵素活性サイトに位置するよう、キャビティー中で大きくそのコンフォメーションが変化する。C 末ドメインでは、ホルミル-CoA からの CO 脱離反応が進行し、CO と CoA が生成する。

Several accessory proteins are required for the assembly of the metal centers in hydrogenases. In NiFe-hydrogenases, CO and CN^- are coordinated to the Fe in the NiFe dinuclear cluster of the active center. Though these diatomic ligands are biosynthesized enzymatically, detail mechanisms of their biosynthesis remain unclear. Here, we report the structural characterization of HypX responsible for CO biosynthesis to assemble the active site of NiFe hydrogenase. CoA is constitutionally bound in HypX. Structural characterization of HypX suggests that the formyl-group transfer will take place from N^{10}-formyl-THF to CoA to form formyl-CoA in the N-terminal domain of HypX, followed by decarbonylation of formyl-CoA to produce CO in the C-terminal domain.

hydrogenase, CO biosynthesis, formyl-CoA

講演番号：3BS-03
講演日時、会場：3 月 20 日 15:50～ ミーティングルーム B

キチン分解とバイオミネラリゼーション形成制御の関係

Relationships between chitin degradation and formation of biomineralization

○鈴木 道生、近都 浩之、朱 凌霄（東大院農）
○Michio Suzuki, Hiroyuki Kintsu, Lingxiao Zhu (UTokyo)

生物が金属や鉱物を沈着させる現象をバイオミネラリゼーションと呼ぶ。バイオミネラリゼーションによって沈着した金属・鉱物は非常に緻密な構造を持ち、人工的に合成することは困難である。日本で真珠生産に利用されるアコヤガイの貝殻は、外側の稜柱層と内側の真珠層の二つから成り、どちらも炭酸カルシウムを主成分としてキチンとタンパク質の有機マトリックスを含んでいる。稜柱層の炭酸カルシウム結晶内の有機物ネットワークのみを単離したところ、FT-IR のスペクトルよりキチンが主成分であり、LC-MS/MS の結果から有機物ネットワークにはキチン分解酵素が含まれることが判明した。キチン分解酵素の役割を明らかにするため、*in vitro* での炭酸カルシウム結晶形成実験、*in vivo* でのノックダウン実験およびファミリー18 キチナーゼの阻害剤であるアロサミジンを生体に投与する実験を行った。その結果、キチン分解酵素は有機物ネットワーク内のキチン繊維の太さを調整することで、炭酸カルシウムの結晶欠陥の生成に影響を与えていることが判明した。さらに、真珠層においては 2 種のキチン分解酵素が存在しており、ノックダウン実験の結果から真珠層の有機物フレームワークの形成に関与することも明らかとなった。このように生物は、分解酵素を用いて有機物の繊維の太さや長さを調整し、特殊な鉱物の沈着に利用していることが示された。

Precipitation of metals or minerals by the living organisms is called as biomineralizaiton. The biominerals have fine microstructures that are difficult to synthesize artificially. The shell of *Pinctada fucata* consists of a prismatic layer and a nacre layer containing calcium carbonate minerals, proteins and chitin. The organic matrices such as proteins and chitin play important roles to regulate the formation of shell microstructure. FT-IR and LC-MS/MS results showed that the chitin and chitinolytic enzymes were detected from the organic networks inside the calcium carbonate of the prismatic layer. *In vitro* and *in vivo* experiments such as calcium carbonate crystallization experiment, knockdown experiment and inhibitor injection, revealed that the chitinolytic enzymes regulate the length and thickness of organic networks to affect the crystal defects in the prismatic layer. On the other hand, chitin degradation activity was confirmed in the nacreous acid soluble fraction. Injecting of allosamidin and knockdown of the chitinase gene revealed that the chitinolytic enzymes play some roles to regulate the formation of the nacreous layer.

chitin, *Pinctada fucata*, biomineralization

講演番号：3BS-04
講演日時、会場：3 月 20 日 16:15～ ミーティングルーム B

植物のホウ酸トランスセプター

A borate transceptor in plant cells

○高野 順平（大阪府大生命）
○Junpei Takano (Osaka Pref. Univ.)

植物は土壌中で変動する生命金属濃度に膜輸送系を制御して対応し、個体・組織・細胞内の生命金属ホメオスタシスを維持する。メタロイドの一つであるホウ素は、高等植物において細胞壁ペクチンを架橋することで必須の働きを担う。多くの生命金属と同様に、ホウ素は蓄積しすぎると過剰害を及ぼす。低ホウ素時のシロイヌナズナの根では、ホウ酸チャネル NIP5;1 とホウ酸アニオン排出型トランスポーターBOR1 がホウ素の吸収と中心柱への移行を促進する。一方、高濃度のホウ素にさらされると、BOR1 は K63 結合型ポリユビキチン化を受け、エンドサイトーシスにより液胞へ輸送されて分解される。BOR1 のエンドサイトーシスと分解はホウ素過剰を予防するために重要な応答反応である。私達は、BOR1 の分解を引き起こすホウ素センシング機構を解析し、BOR1 の野生型およびアニオン結合ポケット周辺アミノ酸の変異型において、ホウ酸アニオン輸送活性とポリユビキチン化・液胞輸送に強い相関があることを見出した。BOR1 がトランスセプター（トランスポーター兼レセプター）として、その輸送サイクルに依存してホウ酸濃度を感知し自己制御を行うシンプルなメカニズムを紹介したい。

Boron (B) is a metalloid required for plant growth through its function in cross-linking the cell wall pectin. In the roots of *Arabidopsis thaliana* under low B conditions, a boric acid channel NIP5;1 and a borate exporter BOR1 are required for efficient uptake and translocation of B. Importantly, upon high-B supply, BOR1 is rapidly ubiquitinated and transported to vacuole for degradation to avoid accumulation of B to a toxic level in tissues. In this study, we showed that BOR1 undergoes K63-linked poly-ubiquitination. Our forward genetic screen and targeted mutational analysis indicated a relationship between B-transport activity and poly-ubiquitination of BOR1. In analogy with regulatory mechanisms of amino acid transporters in yeasts, our results suggest that poly-ubiquitination of BOR1 relies on its conformational transition during the transport cycle. We propose that BOR1 is a transporter-receptor, “transceptor”, directly senses the B concentration and promotes its own poly-ubiquitination and degradation.

metals, boron, transporter

講演番号：3BS-05
講演日時、会場：3 月 20 日 16:40～ ミーティングルーム B

メラニン生合成における亜鉛の役割

Zinc plays a pivotal role in melanin biosynthesis

○神戸 大朋（京大院生命）
○Taiho Kambe (Kyoto Univ.)

メラニン色素は、黒～黒褐色を示すユーメラニンと赤褐色～黄色を示すフェオメラニンからなる。ユーメラニンとフェオメラニンは、メラノサイト内のメラノソームにおいてチロシンを出発とする酵素反応を経て生合成されており、その過程ではチロシナーゼ酵素群が必須の役割を果たしている。チロシナーゼ酵素群にはチロシナーゼ（TYR）の他に、チロシナーゼ関連タンパク質 1（TYRP1）とチロシナーゼ関連タンパク質 2（TYRP 2）の２つがあり、TYRP1 と TYRP2 は、TYR と高い相同性を示す。この中で TYR に関しては解析が進展しており、活性中心に銅を配位することや、この銅がゴルジ体局在型の銅トランスポーターATP7A によって供給されることなどが明らかにされている。これに対して、TYRP1 と TYRP2 に関する知見はほとんど蓄積されていない。TYRP1 と TYRP2 が TYR と相同の構造を持つと示唆されたことから、両者の配位金属も銅であり、同様の機能を有すると信じられてきた。しかしながら、2017 年に TYRP1 の結晶構造が明らかにされた結果、予想に反して、活性中心には銅ではなく亜鉛が配位していた。この結果により、現在、TYRP1 と TYRP2 に配位する金属に関しては、情報が錯綜している。我々は、チロシナーゼ酵素群に配位する金属に関して解析を進めており、本発表では、特に TYR と TYRP1 の機能に関する解析結果について紹介したい。

Melanin biosynthesis requires tyrosinase protein family consisting of tyrosinase (TYR), tyrosinase-related protein 1 (TYRP1), and tyrosinase-related protein 2 (TYRP 2). These three proteins show high sequence identify. TYR has oxidase activity, and possesses two copper ions coordinated at the active center. The Golgi-resident copper transporter ATP7A plays a pivotal role in the coordination of TYR with copper. In contrast, the coordination metals for TYRP1 and TYRP2 have not yet been clarified, although it was suggested that they have a homologous structure to TYR, and thus copper ions would be coordinated at their active site. The crystal structure of TYRP1 was reported in 2017, which showed that TYRP1 has homologous structure to TYR, as expected. However, it was a surprising result that the coordinated metals at the active center are not copper ions but zinc ions. Currently, information about the metals coordinated at the active center of TYRP1 and TYRP2 is complicated. We have investigated which metals are coordinated in tyrosinase family proteins. Here, I will overview how TYR, TYRP1, and TYRP2 cooperatively contribute to melanin biosynthesis, and present our results how TYR and TYRP1 are maturated through binging metal ions during the secretory process.

Zinc, Melanin, Tyrosinase

講演番号：3BS-06
講演日時、会場：3 月 20 日 17:05～ ミーティングルーム B

チロシナーゼにおける銅イオンの位置遷移

Copper migration in tyrosinase molecule

○藤枝 伸宇 (阪府大生命)
○Nobutaka Fujieda (Osaka Pref. Univ.)

チロシナーゼは微生物から哺乳類まで、ありとあらゆる生物に存在するユビキタスな銅タンパク質であり、メラニン合成経路における鍵反応を触媒する酵素である。また、化粧品における美白を初め、食品の品質を低下させる褐変現象、色素異常症に代表される疾患などに関与するため、チロシナーゼの成熟過程に関する研究が古くから続けられてきた。チロシナーゼは反応性の非常に高い *o*-キノン化合物を産生するため、細胞内ではその活性が精密に制御されている。チロシナーゼでは活性サブユニットの他に活性を抑えるためや銅イオンの取り込みに関与する別のサブユニットが結合していることが知られてきたが、それらの制御に関して明確な機構は分かっていなかった。そういった背景のもと、これまで我々は、麹菌由来のチロシナーゼを用いて成熟過程や触媒サイクルにおける銅イオンの遷移について研究してきた。このチロシナーゼには活性制御ドメインが存在し、不活性型では基質結合部位を完全に塞いでいる。また、この制御ドメインの存在下でも保存されたシステインが存在する長いループ部位が遊離の銅イオンを補足し、活性部位に運搬する。更にこの過程において、銅結合部位近傍のシステイン残基が銅イオンに配位したヒスチジンと共有結合を形成する。このように、二核銅部位が形成されたあと、プロテアーゼによって活性制御ドメインが消化され、活性型に変化する。一方で、この活性型チロシナーゼでは、活性中心において銅イオンが数 Å の範囲を遷移し、いくつかの安定な結合状態がある。さらには、この活性中心の銅イオンが、基質の結合に伴い、大きく結合部位や配位構造を変化させて、反応を進行させている。本講演ではこれらの詳細について発表する。

Tyrosinase is an ubiquitous enzyme which catalyzes the key step of the formation of melanin. Since tyrosinase produces the quinone compounds that is highly reactive and often toxic, its quality is severely controlled in the cell. We have studied about the copper migration in the maturation process including the reconstitution of dicopper center as well as the catalytic cycle. In the copper uptake, the conserved cysteine residues grab the free copper ions and transport them into the cavity of apo-tyrosinase. In the catalytic cycle as well, the copper ions binding to the active site move within a few angstroms to facilitate the catalytic reaction.

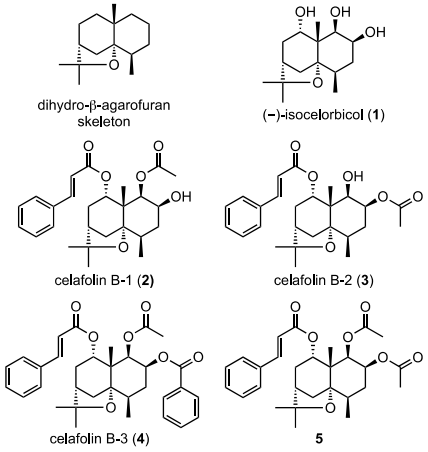
Copper protein, Copper chaperone, Tyrosinase

講演番号：3CS-01
講演日時、会場：3 月 20 日 15:05～ ミーティングルーム C

生物活性ジヒドロ-β-アガロフラン天然物の合成研究：(-)-isocelorbicol の高立体選択的合成から展開する celafolin B-1, B-2, B-3 の全合成

Stereocontrolled Total Synthesis of (−)-Isocelorbicol and Its Elaboration to Natural Dihydro-β-agarofuran Esters

毛利 朋世[2]、高橋 祐介[2]、桑原 重文[2]、○小倉 由資[1,2] ([1]東大院農生科、[2]東北大農)
Tomoyo Mohri[2], Yusuke Takahashi[2], Shigefumi Kuwahara[2], ○Yusuke Ogura[1,2] ([1]The Univ. Tokyo, [2]Tohoku Univ.)



現在までに 500 種以上の dihydro-*β*-agarofuran 骨格を有するセスキテルペン類が単離・報告されている[1)]。本天然物群の構造多様性は同炭素骨格の酸化度や酸化位置の違いに加え、その酸化によって導入された水酸基の全てまたは一部が様々なカルボン酸とのエステルになっていることに因る。さらに、これらが多種多様な生物活性を示すことも本天然物群の興味深い点である。近年我々は、本骨格の効率的な構築法を確立して種々の生物活性 dihydro-*β*-agarofuran 天然物の合成へと展開すべく、(–)-isocelorbicol (**1**)とそのエステル誘導体である celafolin B 類（2-4)をターゲットとして合成研究を行って来た。**2–4** およびその類縁体である **5** はニシキギ科の植物であるオオツルウメモドキより単離・構造決定された[2)]。本化合物群は細胞毒性や神経保護作用など、様々な生物活性を示すことから医薬品への応用の可能性が期待される[2,3)]。また、その母核である **1** もツルウメモドキの種子油けん化物より単離されている[4)]。**1** は *trans*-デカリン環に THF 環が縮環し、2 つの四置換炭素を含む 7 つの不斉中心が密集した興味深い構造を有する事から合成化学者の注目を集め、過去に 4 例の合成が報告されている。しかしいずれも工程数や収率、立体化学の制御に改善の余地を残すものであった。我々は効率的かつ高立体選択的で大量合成に耐え得る **1** の合成経路を確立し、それを起点として生物活性天然物 **2**–**5** の全合成を達成した[5)]ので本シンポジウムで報告する。

The total synthesis of celafolins B-1 (**2**), B-2 (**3**), B-3 (**4**) and **5**, has been accomplished via a highly stereocontrolled 14-step access to their common core triol, (−)-isocelorbicol (**1**). A semipinacol rearrangement of an epoxy alcohol to install a quaternary carbon, diastereoselective conjugate reduction of a spirocyclic butenolide for the establishment of a methyl bearing chiral center, and ring-closing metathesis to construct the decalin ring system were exploited as the key steps for the high yielding synthesis of (−)-isocelorbicol. In this symposium, we will discuss about the details of our synthetic studies on these dihydro-*β*-agarofuran esters.

1) Gao, J.-M. *et. al. Nat. Prod. Rep.* **2007**, *24*, 1153.; 2) Takaishi, Y. *et al., J. Nat. Prod*. **1993**, *56*, 815.; 3) Zhao, W. *et al., J. Nat. Prod.* **2015**, *78*, 2175.; 4) Smith, C. R. *et al., J. Org. Chem*. **1976**, *41*, 3264.; 5) Mohri, T. *et al. Org. Lett.*, **2020**, *22*, 9234.

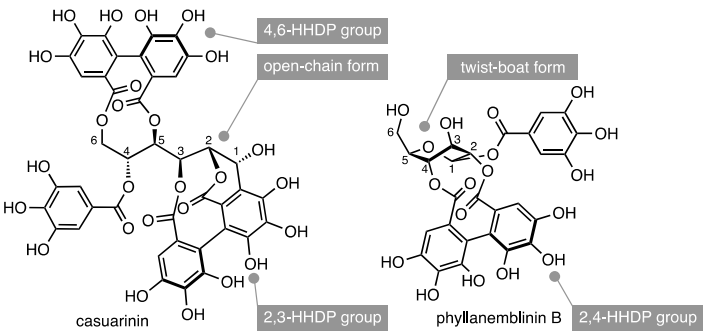
dihydro−β−agarofuran, isocelorbicol, celafolin

講演番号：3CS-02
講演日時、会場：3 月 20 日 15:33～ ミーティングルーム C

ポリフェノールの一種であるエラジタンニンの化学合成研究

Studies on the chemical synthesis of ellagitannins, a class of polyphenols

○若森 晋之介、松本 慎太郎、楠木 怜奈、村上 慧、山田 英俊（関西学院大理工）
○ Shinnosuke WAKAMORI, Shintaro MATSUMOTO, Reina KUSUKI, Kei MURAKAMI, Hidetoshi YAMADA (Kwansei Gakuin Univ.)



エラジタンニンは, 加水分解によってエラグ酸と多価アルコール（主に D-グルコース）を生じるタンニンの総称であり，1,000 以上の天然物が知られているポリフェノールの一種である。その生物活性は抗酸化作用や収れん作用など多様であり，近年健康増進への応用が期待されている。構造的な特徴として, D-グルコースのヘキサヒドロキシジフェノイル（HHDP）基がエステル結合しており，構成する D-グルコースが安定なイス型配座だけではなく多彩に富んだ立体配座を持つ。これまで私たちはエラジタンニンの化学合成に取り組んでおり，下記の 2 つの化合物に関して発表する。

Casuarinin は，鎖状グルコースの 2,3 位酸素上と 4,6 位酸素上に 2 つの HHDP 基を有しており，2,3-HHDP 基は 1 位炭素と *C*-グリコシド結合している。新たな酸化的カップリングの反応を開発し，オキシムを用いた立体選択的な *C*-グリコシル化反応を用いて全合成を達成した [1]。

Phyllanemblinin B は，ねじれフネ型グルコースの 2,4 位酸素上に HHDP 基を有する。グルコースの立体配座に着目した経路にて，2,4-HHDP 基の構築に成功し phyllanemblinin B を全合成した [2]。

1) Wakamori, S.; Matsumoto, S.; Kusuki, R.; Ikeuchi, K.; Yamada, H. *Org. Lett.* **2020**, *22*, 3392.
2) Matsumoto, S.; Wakamori, S.; Nishii, K.; Tanaka, T.; Yamada, H. *Synlett* **2020**, *31*, 1389.

Ellagitannins are a class of polyphenols providing D-glucose and ellagic acid by hydrolysis. Since their bioactivities are diverse, including antioxidant and astringent effects, ellagitannins are expected to be applied in health progress. In this symposium, the chemical synthesis of the following compounds is described.

Casuarinin consists of two HHDP groups on O-2,3 and O-4,6 of the open-chain type glucose, which the 2,3-HHDP group links to C-1 through a *C*-glycosidic bond. Development of an oxidative coupling method and a stereoselective *C*-glycosylation reaction using an oxime achieved the total synthesis of casuarinin.

Phyllanemblinin B contains a HHDP group bridging between O-2 and O-4. Focusing on the steric configuration of glucose, an atroposelective construction of 2,4-HHDP group synthesized phyllanemblinin B.

organic synthesis, polyphenol, ellagitannin

講演番号：3CS-03
講演日時、会場：3 月 20 日 16:01～ ミーティングルーム C

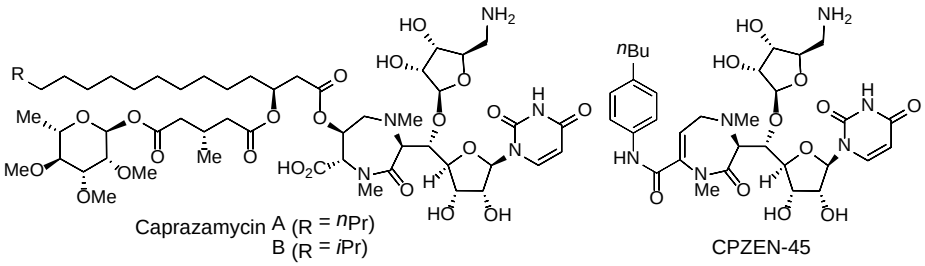
挑戦しがいのある標的天然物：カプラザマシン類の全合成

Total Synthesis of Caprazamycin-A Based on New Strategys

○塚野 千尋（京大院農）
○Chihiro Tsukano (Kyoto Univ.)

我々は、「合成標的として挑戦的な天然物はどのような分子か？」を熟考しながら全合成研究に取り組んでいる。全合成の難易度を何か一つの要因で説明するのは難しく、常に複合的な理由が存在する。また、複雑、あるいは、不安定な構造を持つ分子は、それだけで、合成を完了するのが難しく、新しい合成戦略の創出も重要となる。そのような視点で、今回、我々の研究の一部について、リポヌクレオシド系天然物の全合成を通して紹介したい。

リポヌクレオシド系天然物はウリジン、アミノ酸ユニット、アミノ糖、脂肪酸側鎖等を合わせ持つ中分子である。本天然物群に属するカプラザマシン類、および、その誘導体は、結核菌 *Mycobacterium tuberculosis* にのみならず、多剤耐性を有する *M. tuberculosis* に対しても抗菌活性を示す。また、これらは、新規活性発現機構を有していることから注目されている。興味深い構造かつ重要な生物活性を有するにもかかわらず、研究を開始した当初は、本天然物の全合成は達成されていなかった。我々は様々なリポヌクレオシド系天然物の合成にも利用可能なβ– ヒドロキシアミノ酸誘導体のジアステレオ選択的合成法や脂肪酸側鎖の導入法を確立し、初の全合成を達成した。さらに本全合成を発展させて、CPZEN-45 の全合成も達成した。本発表では、その要点について説明する。[1-3]



Caprazamycins are classified into liponucleoside antibiotics which are structurally composed of uridine, aminoribose, and fatty acid side-chain. Recently, we have achieved total syntheses of caprazamycin A and CPZEN-45 by developing new synthetic methods including a diastereoselective aldol reaction for syn-b-hydroxyamino acid derivatives and stepwise introduction of fatty acid side-chain.[1-3] We will report the detail of these total syntheses.

1) Nakamura, H.; Tsukano, C.; Takemoto, Y. *et al. Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 14190.
2) Nakamura, H.; Yoshida, T.; Tsukano, C.; Takemoto, Y. *Org. Lett.* **2016**, *18*, 2300.
3) Nakamura, H.; Tsukano, C.; Takemoto, Y. *et al. J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 8627-8540.

total synthesis, synthetic strategy, antibiotics

講演番号：3CS-04
講演日時、会場：3 月 20 日 16:29～ ミーティングルーム C

多様な立体・骨格を有する類縁体合成を指向した天然物合成戦略

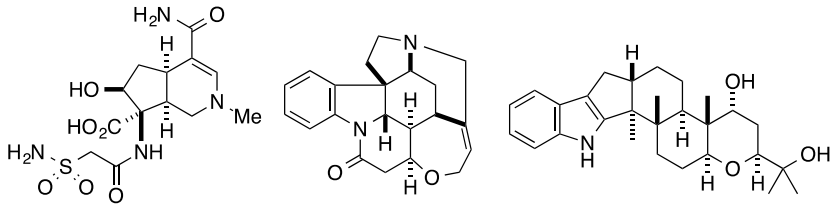
Strategy for diversity-oriented synthesis of natural products

○早川 一郎（日大院総合基）
○Ichiro Hayakawa (Nihon Univ.)

これまでに我々は『興味深い生物活性を示す天然物の全合成』と『全合成経路を基盤とした天然物アナログの設計による生体機能分子の開発』の 2 つのテーマを柱として研究を展開してきた．我々は天然物合成には３つの役割があると考えている．すなわち，**１）天然物の最終的な構造確認（絶対立体配置も含む），２）稀少天然物の量的供給，そして３）天然物の構造最適化による生体機能分子の開発**，である．我々が特に最近感じているのは３）の重要性である．これは我々が大環状マクロライドの『たった 1 箇所』のヒドロキシ基の立体化学を反転させただけで，細胞毒性が 1/1000 まで低下した経験に起因する．すなわち，ヒドロキシ基の立体化学を反転させたことにより，分子全体の立体配座が大きく変わり，標的タンパク質との結合様式が変わってしまい，活性が低下したことを明らかにした．逆に立体化学を改変すると，天然物よりも活性が強くなる例もある．

この経験から，構造が決まった天然物の全合成を目指すだけではなく，『全合成を進めつつ，立体化学や骨格を改変した人工類縁体も合成できる』構造多様性指向型合成戦略を心がけることにした．全合成と同時に多様な立体・骨格を有する類縁体も合成し，小規模ながらフォーカストライブラリーを構築することを目論んでいる．完成にはほど遠いが，このライブラリーから『生体機能分子』となりえる分子が見出されることを期待して，アルテミシジン類，ストリキノスアルカロイド類，およびパスパリン型インドールテルペン類の合成を進めている．これらを題材に我々の合成戦略を紹介する．

Development of biofunctional molecules is an essential research field in the progress of chemical biology and medicinal chemistry. Natural products show various biological activities, thus they are expected to be lead compounds of novel-type of drugs. Also, natural products with a novel mechanism of action are important tools for study of biological phenomena. Thus, we planned to develop the biofunctional molecules based on total synthesis of natural products via diversity-oriented synthesis. In this presentation, we describe our synthetic strategy of natural products.



total synthesis, natural product analogue, diversity-oriented synthesis

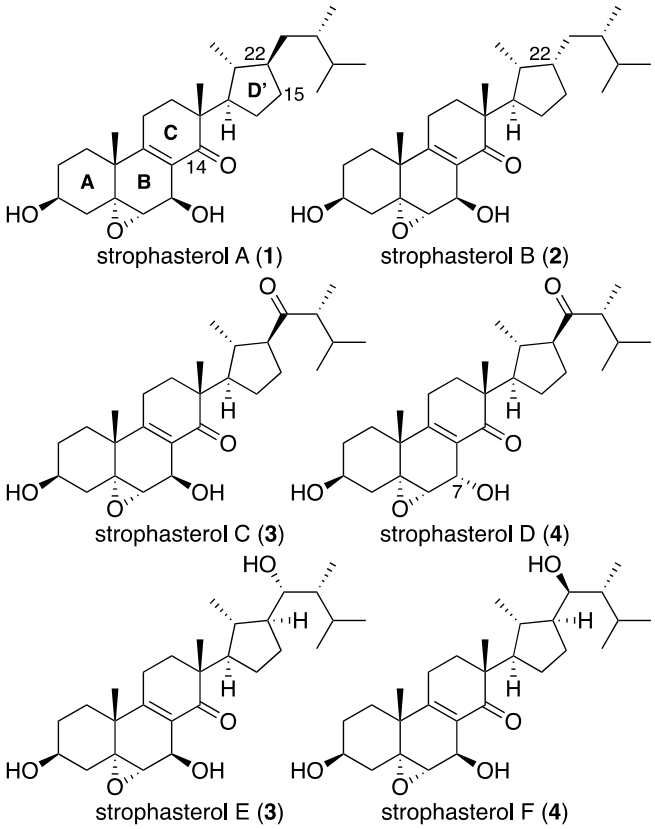
講演番号：3CS-05
講演日時、会場：3 月 20 日 16:57～ ミーティングルーム C

ストロファスタン骨格を有する天然ステロイド化合物の合成研究

Synthetic Studies on Strophastane-Type Natural Products

○桑原 重文[1]、佐藤 俊太郎[1]、福田 裕紀[1]、小倉 由資[1]、權 垠相[2] ([1]東北大院農、[2]東北大院理)
○Shigefumi Kuwahara[1], Shuntaro Sato[1], Yuki Fukuda[1], Yusuke Ogura[1], Eunsang Kwon[2] ([1]Grad. Sch. Agric., Tohoku Univ., [2]Grad. Sch. Sci., Tohoku. Univ.)

近年，strophastane と命名された新規ステロイド骨格[15(14→22)*abeo*-ergostane]をもつ天然ステロイドの単離報告が相次いでいる。それらの化合物（strophasterol A～F）は全てキノコ類から単離されており，strophasterol A (**1**)には神経細胞保護作用，抗 MRSA 活性に加えて，キノコの子実体形成誘導活性が見出されている。本シンポジウムでは，キノコに豊富に含まれるエルゴステロールを原料とし，アシルラジカル環化反応による D′環の構築を基軸とする strophasterol A 及び B（**2**）の合成，ならびにニトリルオキシド中間体の 1,3-双極子付加による D′環の構築と側鎖酸素官能基の導入を経る strophasterol C–F（**3**–**6**）の初の合成について紹介する。本研究により，不明であった strophasterol D の立体化学を決定するとともに，類縁物質として報告された glaucoposterol A の立体化学決定に誤りがあることが判明した。



Two 15(14→22)abeo-ergostanes, strophasterols A and B, have been synthesized from ergosterol by using, as the key step, a completely diastereoselective acyl radical cyclization to forge an isolated cyclopentane ring (D′ ring) unique to this family (strophastane family) of steroidal natural products. The first synthesis of the other strophastanes, strophasteols C–F, has also been accomplished via an a 1,3-dipolar cycloaddition of a nitrile oxide intermediate to simultaneously install the D′ ring and a C23 oxygen functionality. These synthetic studies enabled the stereochemical confirmation of strophasterol C, stereochemical determination of strophasterol D, and stereochemical revision of the related strophastane-type natural product glaucoposterol A.

References: (1) S. Sato, Y. Fukuda, Y. Ogura, E. Kwon, S. Kuwahara, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 10911; S. Sato, S. Kuwahara, *Org. Lett.* **2020**, *22*, 1311; S. Sato, Y. Taguchi, S. Kuwahara, *Tetrahedron* **2020**, *76*, 131129.

strophasterol, synthesis, steroid

講演番号：3DS-01
講演日時、会場：3 月 20 日 15:00～ ミーティングルーム D

プレシジョン栄養学とは何か。データ駆動型栄養学と現状と取り組み

What is “Precision Nutrition”? Current status and initiatives of “Data-driven nutrition”

○小田 裕昭（名大生命農）
○Hiroaki Oda (Nagoya Univ.)

すべての人が健康で健やかな加齢、QOL の高い生活、ウェルビーイングを享受するために、プレシジョン栄養学、個別化栄養学が求められている。「不足の栄養学」の時代の疾患が、栄養素の不足という比較的単純な原因に対して、現代の課題である「過剰の栄養学」によるメタボや生活習慣病は多因子の複合的な原因によるため、単純に栄養素だけでは解決するのが難しい。そのような背景もあり、集団ベースの食事ガイドライン（日本では、「日本人の食事摂取基準」）が生活習慣病予防に十分に効果を発揮していないと評価されている。これまではガイドラインを個人にあてはめる「(演繹的)ルール指向型」であった。ビッグデータの時代になり、「健康」というアウトカム（成果）を目指すことに焦点を当て（「アウトカム指向型」）、様々の食スタイル情報というビッグデータから疾患を予防する食事を提案したり、運動を提案する「データ駆動型栄養学」の発想の転換が今求められている。これがプレシジョン栄養学の基本的考え方であり、従来の考え方とは方向が大きく異なる。ここでは、プレシジョン栄養学の概要と私達の取り組みを紹介する。私達は「日本人の食事摂取基準」を個人対応させた食事摂取基準（「N 式パーソナル食事摂取基準」）を算出する Web ツールを開発し、ガイドラインを類型化した個人対応させたプレシジョン栄養学の試みを行ってきた。

Precision nutrition, or personalized nutrition, is required for all people to enjoy good health, healthy aging, high quality of life, and wellbeing. In the era of "deficient nutrition," diseases were caused by relatively simple deficiencies in nutrients, while metabolic syndrome and lifestyle-related diseases caused by "excessive nutrition" are caused by multiple factors, making it difficult to solve them with nutrients alone. From this background, population-based dietary guidelines (in Japan, "Dietary Reference Intakes for Japanese") have been considered as not being sufficiently effective in preventing lifestyle-related diseases. The guidelines have been "(deductive) rule-oriented" in that they are applied to individuals. In this era of big data, we are now required to change our way of thinking to a "data-driven nutrition" that focuses on achieving outcomes such as "health" ("outcome-oriented") and suggests diets to prevent diseases which are based on big data of various life style information. This is the basic concept of Precision nutrition, which is very different from the conventional way of thinking. In this section, I would like to give an overview of Precision Nutrition and our efforts in this field. We have developed a web tool for calculating the Dietary Reference Intakes for Individuals (the "N-type Individualized Dietary Reference Intakes"), and have been experimenting with precision nutrition that corresponds to individual.

precision nutrition, personalized nutrition, data-driven nutrition

講演番号：3DS-02
講演日時、会場：3 月 20 日 15:30～ ミーティングルーム D

食の臨床試験の健康情報を活用した個別化栄養の取組み

Personalized nutrition based on the data of clinical trials for food

○西平 順（北海道情報大医療情報）
○jun nishihira (Hokkaido Information Univ.)

超高齢社会を迎えた我が国では、医療費や介護給付費の増加を抑え、国民全体が元気であり続ける「健康長寿社会」を実現するかが課題となっている。この課題の解決策の一つとして食事による介入が注目され、そのなかで個々人のニーズに適切に応える食事や食品の機能性の研究が注目されている。北海道情報大学健康情報科学研究センターでは、2008 年に科学的根拠に基づいた食の臨床試験を立ち上げ（文科省地域イノベーション事業)、これまで 105 件の臨床試験を実施している。

本臨床試験にて集積した被験者データの中から、食・生活習慣と健康情報（BMI、血圧、血液バイオマーカー等）の情報を用いて食と健康の関係性について解析している。特に、「食・生活習慣と健康情報及び遺伝的背景」を研究テーマとして、一塩基変異(SNPs)や生活環境の変化によるゲノム修飾に注目し、個別化栄養学の実現を目指している。

個別化栄養学においては、食事については個々の生活環境など多くの要因を同時考慮する必要があることから、AI を導入したパーソナルヘルスケアのシステム開発に取り組み、効果的な食品や栄養素などのアドバイスの仕組みを検討している。本ヘルスケアシステムを導入することにより、食を通した健康管理手法に一石を投じることを期待している。

Japan is facing a super-aging society and is challenging to realize a "healthy longevity". To solve the difficult health issue, dietary intervention has been carried out in terms of health promotion. Foods beneficial for health condition would ameliorate age-related diseases and create healthy life in a long term. The Health Information Science Research Center of Hokkaido Information University established the clinical trials for food in 2008, and completed 105 clinical trials. We have been analyzing various types of health data obtained the clinical trials, e.g., diet/lifestyle questionnaires, blood and genes for the use of personalized nutrition.

We also introduced AI to the healthcare system, by which we would provide appropriate health recommendation to each volunteer. In this presentation, the overall outcomes obtained from the healthcare system is introduced and discussed.

clinical trial, genome, personalized nutrition

講演番号：3DS-03
講演日時、会場：3 月 20 日 16:00～ ミーティングルーム D

腸内環境に基づくプレシジョン栄養学
Gut environment-based precision nutrition

○福田 真嗣[1,2,3,4] ([1]慶大先端生命研、[2]神奈川産技総研、[3]筑波大医学医療系、[4]メタジェン)
○Shinji Fukuda[1,2,3,4] ([1]Inst. Adv. Biosci., Keio Univ., [2]KISTEC-KAST, [3]Univ. Tsukuba Sch. Med., [4]Metabologenomics, Inc.)

ヒトの腸内には多種多様な腸内細菌が生息しており、これらの集団（腸内細菌叢と呼ぶ）は宿主と、あるいは腸内細菌同士が密接に相互作用することで、一定の頑健性を有する複雑な生態系を構築している。バランスの取れた腸内細菌叢は様々な有用物質の産生を介して宿主の健康維持に寄与している一方、様々な環境要因により腸内細菌叢のバランスが崩れると、大腸癌や炎症性腸疾患といった腸そのものの疾患に加えて、自己免疫疾患や代謝疾患といった全身性疾患に繋がることも知られている。われわれはこれまでに、腸内環境の制御を目指したメタボロゲノミクスアプローチを開発し、腸内細菌叢由来代謝物質が宿主–腸内細菌叢間相互作用において重要なことを明らかにした。本成果を社会実装する目的で（株）メタジェンを 2015 年に設立した。本発表では、腸内環境に基づくプレシジョン栄養学が切り拓く、新たな予防医学の創出に向けたわれわれの取り組みについて紹介する。

The gut microbiota form a highly complex ecological community together with host intestinal cells. The so-called gut ecosystem has a profound influence on human physiology, immunology, and nutrition. It has been reported that imbalance in the structure of gut ecosystem could be a risk factor in human disorders including not merely gut-associated disorders, but also systemic diseases. However, the molecular mechanisms of the host-microbial crosstalk remain obscure. To tackle this issue, we firstly developed a highly integrated metabolomics-based approach, metabologenomics, and found that gut microbiota-derived metabolites have beneficial effects on human physiology. For industrialization of these findings, we established Metabologenomics, Inc. in 2015 which try to create a new field of preventive medicine through gut environment-based precision nutrition.

Gut microbiota, Metabolite, Precision nutrition

講演番号：3DS-04
講演日時、会場：3 月 20 日 16:30～ ミーティングルーム D

あらゆる買い物をヘルスケアに～プレシジョン栄養学をめざした実践の試み～

Make every shopping into healthcare~Attempt of practice aiming at precision nutrition~

○小原 一樹、中村 寛子（シルタス 株式会社）
○Kazuki Ohara, Hiroko Nakamura (SIRUTASU inc.)

昨今、日本国内でのスマートフォン保有世帯は 8 割まで増加し、日常生活に欠かせない存在である。公衆衛生の観点から見るとアプリは個人への健康行動変化の介入提供を潜在的に強化し、有利な費用効用をもたらす可能性が示唆されている。
日本国内でも体重、食事、睡眠、運動管理等、多くのヘルスケアアプリが制作されている。しかし、「食事管理」を目的とした ICT は自己記述方式が主流のため記録の面倒臭ささから利用継続の難しく健康無(低)関心層の取り込みが課題である。また、多くの人は自分が必要としている栄養素が何なのかよくわかっていない。そのためメディアで聞く不足しがちな栄養素=自分も不足していると考える。これらは過剰摂取の原因や、本来の欠乏栄養素へも影響を与える。

この問題を解決すべく食生活の根元である購買から商品照合や重量推計、消費予想等を行い、購買履歴を栄養変換する。買い物から栄養診断し栄養バランスが整う食材の買い方、レシピ提案だけでなく買い物傾向から食生活の可視化、予測、嗜好学習性レコメンドを行うことでパーソナルニュートリションの実現を検討した。普段の買い物が栄養状態のチェックにつながる手軽さが最大の特長である。

実証例として、現在、弘前大学 COI・県生活協同組合連合会と連携し、生協店舗会員を対象とした QOL 健診簡易版による健康チェックと SIRU＋の使用による食事・栄養改善サポートを組み合わせた「生協健やかショッピングサポートプログラム」を 2020 年 12 月から開始し、その有用性を検証している。健康行動の促進ツールとしてヘルスケアアプリは特に子育て中の女性や主婦を中心に使用しやすい媒体であり、介入時の可用性向上や個人・集団へ健康情報が到達する可能性など様々な利点がある。

身近なスマートフォンで手軽に情報を取得、介入する栄養教育は現代社会と親和性が高く、継続率の低さ払拭する効果も期待できる。最適な課題発見と課題解決を提供し、データ活用により個々のニーズに応えられるパーソナライズを実現することで栄養管理自動化、そして″頑張らなくても良いヘルスケア″の実現を目指す。

meal management, purchase history, personal nutrition

講演番号：3DS-05
講演日時、会場：3 月 20 日 17:00～ ミーティングルーム D

AI 栄養とプレシジョンヘルス＆ニュートリション

AI (Artificial Intelligence) Nutrition and Precision Health & Nutrition

○阿部 圭一 (医薬基盤・健康・栄養研究所)
○keiichi abe (NIBIOHN)

わが国の平均寿命は、公衆衛生と栄養改善、そして医療の進歩により、この 100 年間で約 2 倍に延び、世界屈指の健康長寿が達成されるに至った。先進国の中における肥満者の割合が少ないことは、メタボリックシンドロームの浸透によるところが大きいものと考えられる。一方で、人生 100 年時代の議論がはじまり、虚弱を意味するフレイル（frailty）が新しい健康課題として注目され始めている。すなわち、やせること、生活習慣病を遠ざけることのみでは健康長寿が達成できないことが理解され始め、痩せすぎないこと、人とのつながりや身体活動などの新たな要素が健康維持の対策に挙げられようとしている。こうした複雑な健康課題に対応するためには、各個人の健康状態を多面的に評価してフィードバックするプレシジョンアプローチが必要となる。例えば、腸内細菌叢の状態が今まで考えられて以上に健康への影響が大きいことが明らかになりつつあるため、新しい健康指標として捉えるべきである。これに加えて、ウェアラブルデバイスの新しい開発も進んでおり、24 時間の健康状態を多面的にモニターすることが可能となっており、ここで得られるビッグデータが個人の健康状態を見極める重要な指標となることが期待されている。こうした健康に関するデータの飛躍的増大に対応するため、あらたに創設した AI 栄養の部門によるプレシジョンヘルス＆ニュートリションの取り組みの可能性について紹介する。

In Japan, the significant extension of lifespan over the last 100 years is believed to be achieved by advances in public health, nutrition and medical care, leading to the achievement of the world's best health and longevity. In addition to metabolic syndrome, discussions on “the 100-year life” have put focus on “frailty” as a major new health index. It is becoming clear that the condition of the intestinal microflora has a greater impact on health than ever thought. In addition, recent progress of wearable devices could help to achieve to monitor the health condition of 24 hours from multiple aspects, providing big data as important index to determine the health condition of each individual. In order to respond to the dramatic increase in data along with a big change in the concept of health, a new department of AI (artificial intelligence) nutrition has been set up to achieve precision health & nutrition.

metabolic syndrome-frailty, precision health and nutrition, AI (artificial intelligence) nutrition

講演番号：3ES-01
講演日時、会場：3 月 20 日 15:05～ ミーティングルーム E

抗体の開発・生産に向けた効率的スクリーニング技術開発

Screening study for antibody preparation in E. coli

○梅津 光央（東北大工）
○Mitsuo Umetsu (Tohoku Univ.)

タンパク質は、アミノ酸配列に起因した相互作用により立体構造を形成し、3 次元的な立体構造を形成するドメインから機能をもちはじめる。1983 年に Ulmer が”Protein Engineering (タンパク質工学)”を提唱してから 37 年を経た現在では､大腸菌などの宿主細胞に目的遺伝子を導入することによって、1 次構造レベルではあるが、自分の好きなアミノ酸配列を持つタンパク質を合成することができるようになった。しかし、設計という面では未だ様々な課題があり、異種な細胞の中で、確実に適切な 3 次構造を形成させることも思うようにいかない。その中で我々は、抗体分子を中心に、その開発に必要な大腸菌発現系の研究を行ってきた。本シンポジウムでは、抗体分子の配列設計や発現系の開発において行ってきたスクリーニング技術を紹介する。

Protein is a polymer composed of amino acids, and the amino acid sequence can define the function and steric structure. Currently, we can create the polypeptide with the amino acid sequence we design by means of host-vector system; however, the folding of the designed sequence cannot be controlled. In this symposium, we show our screening study for antibody preparation with E. coli expression system.

Antibody, E. coli, Recombinant protein

講演番号：3ES-02
講演日時、会場：3 月 20 日 15:33～ ミーティングルーム E

タンパク質生産性を向上させる遺伝子配列設計技術

Gene sequence design technology to improve protein expression

○亀田 倫史 (産総研人工知能)
○Tomoshi Kameda (AIST)

同義置換によるコドン最適化により、蛋白質発現量を増大させる研究は古くからおこなわれているが、最近でも高 IF 雑誌に論文が掲載されるなど、未だに活発に研究されている。その中でも、RNA 二次構造形成傾向が近年注目されている。Goodman らは、開始コドン付近の RNA 二次構造形成傾向を下げることによって、大腸菌での蛋白質発現量を最大 14 倍向上した（2013,Science） 我々は、開始コドン付近の RNA 配列に同義置換を加え、RNA 配列としては異なるものの、同一のアミノ酸配列に対応する配列を全通り生成し、それらの中で、最も形成傾向が高い・低い配列を用いて蛋白質生産を行うことで、発現量を調節することを試みた。また、大腸菌以外の宿主でも、効果があるか調べたところ、発現量を向上・減少させることに成功しており、中には、野生型ではほとんど発現していない蛋白質が、SDSPAGE で濃いバンドが確認できるレベルまで発現した例もあった[1]。現在、これらの設計を誰でも web 上から行うことができるサーバーを構築中であり、詳細は当日報告する。

Codon optimization by synonymous substitutions has been studied for a long time to increase the protein expression level. Goodman et al. improved protein expression in E. coli by up to 14-fold by reducing the tendency of RNA secondary structure formation near the start codon (2013, Science). We attempted to regulate the expression level by synonymous substitutions to the RNA sequence near the start codon, generating all the sequences that correspond to the same amino acid sequence but are different as RNA sequences, and using the sequence with the highest or lowest secondary structure formation tendency among them for protein production. We also examined the effect on hosts other than E. coli, and succeeded in increasing or decreasing the expression level, and in some cases, proteins that were hardly expressed in the wild type were expressed to high level [1]. We are currently constructing a server that allows anyone to perform these designs on the web, and details will be reported on the day.

[1] Yutaka Saito, et al. Developing a codon optimization method for improved expression of recombinant proteins in actinobacteria. Scientific Reports, 9(1):8338, 2019.

protein expression, codon optimazation, gene sequence design

講演番号：3ES-03
講演日時、会場：3 月 20 日 16:01～ ミーティングルーム E

Trichoderma reesei を用いたバイオマス糖化酵素の開発

Development of biomass saccharifying enzyme using *Trichoderma reesei*

○掛下 大視（花王株式会社）
○Hiroshi Kakeshita (Kao corporation)

持続可能な社会の実現のため、環境負荷が少ない石油代替エネルギーの普及に向け、革新的な技術開発及びコスト低減・性能向上のための取り組みが期待されている。バイオマスエネルギーは、カーボンニュートラルとして扱われているため、地球温暖化対策の一手段として重要である。2000 年台以降、燃料としてのバイオエタノールが大きな注目を集めてきたが、食料との競合から、原料に非可食バイオマスを利用した第二世代バイオエタノールを求める声が大きくなった。しかしながら、その普及は現在も足踏み状態と思われる。その理由の１つが、セルロースを分解し糖化するために必要な糖化酵素のコスト高と考えられた。このことから、高効率な糖化酵素の獲得および糖化酵素の生産性向上が必要不可欠である。弊社ではこれまでに *Trichoderma reesei* を用いた糖化酵素の開発検討を進めてきた。

本シンポジウムでは、商業生産を目指し、育種工学や遺伝子工学により有用タンパク質の効率的生産の実例として、*Trichoderma reesei* による糖化酵素の生産について、これまで行ってきた宿主改良について紹介する。

To realize a sustainable society, it is necessary to popularize energy alternatives to oil, which has a low environmental impact. Therefore, we are working on the development of innovative technology. Biomass energy is treated as carbon neutral, so it is important as a means of combating global warming. Since the 2000s, bioethanol has attracted a great deal of attention as one of the biomass energies. Since the use of food as a raw material was denied, second-generation bioethanol made from non-edible biomass was favored. However, second-generation bioethanol is not widespread. One of the reasons was the high cost of the enzyme for saccharifying cellulose. From this, it was considered indispensable to acquire a highly efficient saccharifying enzyme and improve the productivity of the saccharifying enzyme. We have been studying the development of saccharifying enzymes using *Trichoderma reesei*.

In this symposium, we will introduce host improvement for saccharifying enzyme production by *Trichoderma reesei* for commercial production.

Trichoderma reesei , saccharifying enzyme, Commercial production

講演番号：3ES-04
講演日時、会場：3 月 20 日 16:29～ ミーティングルーム E

「Corynex®」：*Corynebacterium glutamicum* によるバイオ医薬品生産
「Corynex®」：Production of biopharmaceuticals in *Corynebacterium glutamicum*
○松田 吉彦、菊池 慶実（味の素(株) バイオ・ファイン研究所)
○Yoshihiko MATSUDA, Yoshimi KIKUCHI (AJINOMOTO Co., Inc.)

Corynebacterium glutamicum はアミノ酸の工業的生産菌として長く利用されてきた産業微生物であり、我々は本菌を用いて独自の異種タンパク質分泌技術を開発し、受託発現サービス Corynex® へと展開している。本系の特徴として、目的タンパク質を正常な構造の活性体として分泌できること、宿主由来の夾雑タンパク質が少なく培養上清中に高純度で蓄積すること、エンドトキシンを産生しないこと等が挙げられる。またこの系の汎用性を高めるために、異なるタンパク質分泌経路である Sec 系と Tat 系の利用、宿主由来の高分泌タンパク質 CspB との融合法、シグナル配列や宿主株のライブラリーの構築等、目的タンパク質ごとに至適な生産菌を効率的に育種する手法を開発してきた。これらの特長を活かし、現在はバイオ医薬品の開発、受託生産へと展開している。

バイオ医薬品は、従来からの主な抗体医薬品に加えて、抗体と同様に抗原と特異的に結合するが構造が異なる低分子タンパク質である様々な Antibody mimetics（Non-antibody scaffolds とも呼ばれる）が近年着目されている。Corynex®の技術を用いてこれら分子種の生産菌開発を検討した結果、ABD、Adnectin™、Affibody®、Affilin®、Affimer®、Alphabody™、Anticalin®、Avimer®、Centyrin™、Fynomer®、Knottin、Kunitz domain、Nanofitin®等の様々な分子の高分泌生産、さらに各分子骨格のモノマー型に加えて DARPin®や VHH のタンデム型分子の生産にも成功した。即ち、Corynex®は次世代のバイオ医薬品生産の発現プラットフォームとして様々な Antibody mimetics の生産に適した系であることが示された。本研究は、AMED の課題番号 JP20ae0101055 の支援を受けた。

We have developed a unique recombinant protein secretion system by using *Corynebacterium glutamicum* and protein expression service Corynex®. This system has some advantages such as the secretion of correctly folded and active form, high purity, and endotoxin-free. To expand the versatility of this system, we have developed the efficient breeding technologies which are utilizing Sec- and Tat-secretion pathways, CspB-fusion, signal peptide library, and host strain library. Now we are applying the system to produce biopharmaceuticals. Recently, there are focused on antibody mimetics as well as conventional major antibody therapeutics in the biopharma field, so we have tried the strain development to produce these proteins. As a result, various kinds of proteins could be successfully secreted, so it was demonstrated that Corynex® is very suitable system to produce antibody mimetics. This research was supported by AMED under Grant Number JP20ae0101055.

Corynebacterium glutamicum, biopharmaceuticals, antibody mimetics

講演番号：3ES-05
講演日時、会場：3 月 20 日 16:57～ ミーティングルーム E

タンパク質源としてスピルリナを新たな農作物にする
Making Spirulina a New Crop as a Protein Source

○佐々木 俊弥 (株式会社タベルモ)
○Toshiya Sasaki (Taberumo Corporation)

代替タンパク質関連のビジネスと研究開発が勃興している。背景には、おいしく加工する技術が向上したことの他、健康、動物愛護、資源枯渇、気候変動といった課題解決ニーズがある。多くのプレーヤーは既存穀物をどう有効活用してタンパク質製品にするかに焦点を置いている。
これに対し、我々は「食べる藻」、スピルリナの大規模高効率栽培によって、新たなタンパク質生産農業を興そうとしている。スピルリナは大豆の 20 倍の単収でタンパク質を生産でき、その分 CO^2 削減にも繋がり、水の使用量も少なく、土壌を選ばない、最も効率的な光合成作物になると考えているためである。シンポジウムでは、タンパク質サプライヤーになるための道筋を示し、2019 年に竣工したブルネイ工場における生産と、技術開発の取り組み、市場への普及活動について紹介する。

Alternative protein-related businesses and R&D are emerging. The main reason behind this is the improvement of technology to process food in a tasty way. In addition to that, there is a need to solve issues such as health, animal welfare, resource depletion, and climate change. Many players are focusing on how to effectively utilize the grains already grown and convert them into protein products.
In contrast, we are trying to create a new type of protein-producing agriculture by cultivating the ″Eating Algae″ Spirulina with high efficiency on a large scale. We believe that Spirulina will be the most efficient photosynthetic agriculture. Because it can produce a protein with 20 times higher yield than soybeans, thus reducing CO2 emissions, using less water, independent of soil. In the symposium, we will show the roadmap to becoming a protein supplier and introduce the production plant completed in 2019 in Brunei, as well as the technology development efforts and market dissemination activities.

Protein, Spirurina, Algae

講演番号：3FS-01
講演日時、会場：3 月 20 日 15:00～ ミーティングルーム F

メンブレンベシクル形成機構の多様性と普遍性

Various routes for bacterial membrane vesicle formation

○豊福 雅典 (筑波大 生命環境)
○Masanori Toyofuku (Univ. Tsukuba)

細菌は細胞外膜小胞(メンブレンベシクル:MV)に膜小胞を放出することが知られており、その機能は遺伝子の水平伝播や毒素の運搬、さらには細胞間コミュニケーションに関わるなど、多様である。MV がどのように機能するかを理解するためにはその形成メカニズムの解明は必須である。長い間、膜がたわむ形で形成されるものを古典的に MV と呼んできたが、この膜がたわむ blebbing モデルでは MV の全てを説明できないことが明らかになってきた。我々は、blebbing に対し、細菌が破裂して MV を形成するグラム陰性菌の explosive cell lysis を新たに提唱した。本機構には細胞壁の分解が関わっており、続いて、グラム陽性菌でも同様に細胞壁の分解によって MV が形成される(bubbling cell death)を明らかにした。さらに、最近では外膜を有するグラム陽性菌であるミコール酸含有細菌の MV 形成機構を解析したところ、異なる経路によって、外膜あるいは内膜由来の MV が形成されることが明らかとなった。MV は我々が考えていたよりも多様で、されゆえに多様な機能を発揮することができるのかもしれない。本発表では、これまでに明らかにしてきた MV 形成機構を紹介し、MV の多様性と普遍性について議論する。

Bacteria release membrane vesicles that have diverse functions involved in biological process such as horizontal gene transfer, toxin delivery and bacterial communications. To understand how cargos are delivered via MVs, the understanding of the MVs formation are fundamental. MVs were once thought to be formed only through the pinching of the membrane but this mechanism (blebbing mechanism) fail to explain how Gram-positive bacteria form MVs and also why cytoplasmic material are often found to be associated with MVs formed by Gram-negative cells. We have found that in *Pseudomonas aeruginosa*, MVs can be released through explosive cell lysis. Explosive cell lysis is trigger by the degradation of peptidoglycan. More recently we showed that cell wall degradation is also a key in step in MV formation of a Gram-positive bacterium, *Bacillus subtilis*. Given the importance of cell wall degradation in structurally distinct bacteria, we next aimed to understand MV formation in Mycobacteria. Mycobacteria are Gram-positive cells that possess an outer membrane (mycomembrane). Our results show that Mycobacteria can form both inner membrane (IM) and outer membrane (OM) vesicles depending on the conditions. These vesicles are formed through different routes from growing cells or dying cells. Our data indicate that MVs are heterogenous and different types of MVs exist.

membrane vesicle, cell death, bacterial interaction

講演番号：3FS-02
講演日時、会場：3 月 20 日 15:25～ ミーティングルーム F

細菌膜観察で見出された型破りな膜小胞形成

Visualization of bacterial membranes revealed unconventional formation of membrane vesicles

○田代 陽介[1,2] ([1]静大院総合科技、[2]JST さきがけ)
○Yosuke Tashiro[1,2] ([1]Shizuoka Univ., [2]JST PRESTO)

膜小胞は多くの細菌が放出する直径数十から数百 nm の細胞外小胞である。膜小胞には様々な微生物由来の物質が高濃度に内包されており、遺伝子水平伝播、細胞外電子伝達、細胞間情報伝達、病原因子運搬の媒体として機能している。一方、膜小胞の形成には様々な因子が関与しており、その形成メカニズムについてはいまだ不明な点が多い。本講演では、今まで膜小胞研究には導入されていなかった観察手法により、ユニークな膜小胞形成機構を発見した成果を紹介する。

細胞内部構造の観察を行うために、急速凍結レプリカ電子顕微鏡法を用いて膜小胞過剰形成細菌を観察した。本手法では細胞の割断面を作製し平均化していない個々の分子を観察可能である。当手法により *Buttiauxella* 属細菌の膜小胞過剰生産変異株を観察した結果、グラム陰性菌の内膜と外膜の歪みが膜小胞形成に重要であることが示された。また、多重構造の膜小胞が今までに例のない機構で放出されることが明らかとなった。一方、蛍光顕微鏡観察で 50 nm ほどの膜小胞を観察するためには、膜小胞内に特異的に局在する物質を染色する必要がある。膜湾曲部位に局在する特性を持つアニオン性リン脂質を染色すると緑膿菌の膜小胞放出を観察可能であることが蛍光顕微鏡観察により明らかとなった。以上の結果から、上記観察手法は膜小胞形成機構の理解に有効であることが示された。

Many bacteria secrete spherical membrane nanoparticles (20-400 nm in size) from the bacterial surface to extracellular milieu. These liposome-like particles are called as “membrane vesicles (MVs)” and have important roles in several biological functions, including efflux of cellular substances, delivery of genetic materials and virulence. While MV biogenesis has been studied in many years, the mechanism of MV secretion has not fully understood. Here I introduce effective technologies to observe MV secretion in bacteria.

Cells were visualized using quick-freeze, deep-etch electron microscopy, which technology is used to visualize biological specimens in an active state as a shot image with spatial resolution of the order of nanometers. In the result, MVs were released at the site of loose outer membrane in Gram-negative bacteria. In addition, to observe MV secretion using fluorescence microscopy, MVs are needed to be detected with the specific fluorescent label. Anionic phospholipids, which are localized at cell poles of bacteria, were aggregated at the MV-forming site. Therefore, anionic phospholipids can be an appropriate marker for observing MV biogenesis in bacteria. These visualizing technologies would contribute to understanding unrevealed mechanism on MV biogenesis in bacteria.

Membrane vesicles, Anionic phospholipids, Multilamellar

講演番号：3FS-03
講演日時、会場：3 月 20 日 15:50～ ミーティングルーム F

発酵食品や腸管に関連する細菌の細胞外膜小胞の特性

Characterization of extracellular vesicles released by intestinal bacteria and fermented food-derived bacteria

○倉田 淳志（近畿大農）
○Atsushi Kurata (Kindai Univ.)

微生物は、ナノサイズの細胞外膜小胞（Extracellular vesicles；EVs、およその粒径 50～100 nm）を生産する。EVs には、微生物に由来するタンパク質や核酸、代謝中間体が含まれ、これらの構成成分は EVs によって周辺の細胞へ伝達される。一方、動物の腸管や発酵食品では特徴的な微生物が多様な物質を生産しており、微生物由来の代謝産物が我々の健康維持や増進に関与していることは経験的に明らかである。しかし、腸管の内容物や発酵食品を対象とした EVs の検出はほとんど検討されていない。また、発酵食品や腸管に関連する微生物の EVs による宿主への影響はほとんど解明されていない。そのような中、我々の研究室では発酵食品や腸内の微生物の培養液から EVs を見いだし、EVs の特徴と機能の一端を明らかにしつつある。本講演では、乳酸菌などの腸内細菌が生産する EVs の特徴や構成成分、EVs によって惹起される宿主細胞の応答、EVs 中の作用因子について、得られた知見を紹介する。

Generally, most bacteria release extracellular vesicles (EVs) with the size ranging from 50 to 100 nm. These EVs contain specific proteins, DNA, RNA, and metabolic intermediates from the bacteria. The human gastrointestinal tract and fermented foods harbor the complex and dynamic populations of microorganisms. It has been assumed that the EVs released by intestinal bacteria and fermented food-derived bacteria play critical roles in the host-bacteria interactions. Here, I would like to introduce the structural characteristics and functionalities of the EVs.

Extracellular vesicles, Intestinal bacteria, Fermented foods

講演番号：3FS-04
講演日時、会場：3 月 20 日 16:15～ ミーティングルーム F

細菌と宿主の細胞外小胞がもたらす炎症惹起のメカニズム

The alternative mechanism for pro-inflammatory signal by the extracellular vesicles mediate.

○岡 真優子[1]、今宮 里沙[2] ([1]京都府大院生命環境、[2]京都府大生命環境)
○Mayuko Oka[1], Risa Imamiya[2] ([1]Grad. Sch. Life Env. Sci, Kyoto Prefectural Univ., [2]Kyoto Prefectural Univ.)

哺乳動物細胞によって分泌されるエキソソームは、細胞内のエンドソームで形成される非常に小さな脂質二重膜小胞であり、内部に選り抜かれたタンパク質や核酸を含んでいる。エキソソームは、内包物を介した炎症や細胞障害作用をもつ一方、細胞の恒常性維持にも寄与していることが近年知られるようになった。我々は、大腸菌存在下でマクロファージが、エキソソームにより炎症性サイトカインを誘導する現象を見いだした。また、この現象には、菌体ではなく生菌の産生する外膜由来小胞（OMV）が必要であった。すなわち、マクロファージは、大腸菌と直接作用することなく、エキソソームによって炎症性サイトカインを誘導していたのである。さらに、エキソソームの炎症誘導の鍵となる因子を探索したところ、colicin I（抗菌ペプチド）受容体（CirA）が有力な候補因子として見いだされた。CirA タンパク質は、グラム陰性細菌の外膜上でポアを形成し、鉄を輸送するタンパク質を取り込む作用を持つ。一方、OMV に内包され細胞外に分泌される CirA タンパク質の役割は報告されていない。そこで、この OMV-CirA とマクロファージとの相互作用を詳細に解析した。本研究は、OMV とエキソソームの 2 つの細胞外小胞が引き起こす、細菌と免疫細胞の間接的な相互作用による炎症機構である。大変興味深いことに、大腸菌から産生される OMV 産生量は抗菌薬によってさらに増加した。このことは、菌体だけでなく OMV もまた、細菌感染症の治療標的の 1 つになる可能性を示唆すると考える。

Living thing creates a many kind of extracellular vesicles (EVs) and the EVs are known to have a role of cell-signaling. In mammalian, exosomes are released from intracellular compartments, late endosomes, after fusion with the plasma membrane. These particles are released from viable cells, either constitutively or upon activation of cell secretion, but not from lysed or apoptotic cells. Thus, exosomes have been considered as a mediator of cell-to-cell communications. Moreover, exosomes are enriched in various bioactive materials, including proteins, lipids, mRNA, and microRNA. We previously revealed that the exosomes derived from macrophages (Mφ) that were infected with *Escherichia coli*, induced pro-inflammatory factors in uninfected Mφ. The inflammation-inducing exosomes was elicited by the outer membrane vesicles (OMVs) of *E. coli*, but not the bacterial cells or lipopolysaccharide. This study shows the alternative mechanism for pro-inflammatory signal by two extracellular vesicles mediate.

exosome, macrophage, outer membrane vesicle

講演番号：3FS-05
講演日時、会場：3 月 20 日 16:40～ ミーティングルーム F

膜小胞応用のための量的コントロールおよび表面提示・改良に関する研究

Improvement in quantity and surface display for membrane vesicle (MV) production by Meiothermus ruber H328

○渡部 邦彦（京都府大・院生環）
○Kunihiko WATANABE (Kyoto Pref. Univ.)

膜小胞 (membrane vesicle: MV) は、酵素タンパク質などを表層提示するための新規な天然キャリアーとしての利用に加えて、精製不要の簡便な抗体作製や腸内細菌による薬剤のドラッグデリバリーシステム (DDS) への応用など多方面で期待されている [1)]。

我々は神戸・有馬温泉から単離した *Meiothermus ruber* H328 を用いて MV の研究を行っている [2)]。本菌株はグラム陰性の好熱性細菌で、産業廃棄物であるトリ羽毛を強力に分解する [3)]。この分解を担うケラチン分解性プロテアーゼをゲノム解析情報から同定し、巨大分子複合体として MV にも含まれることを確認している。そこで MV の有効な応用のための量的および質的コントロール・改良を現在検討している。まず量的改善のため、シャペロン遺伝子 *degP* の破壊による量的変化を調査した。H328 株の遺伝子破壊（*ΔdegP*）株を作製し、蛍光試薬を用いた解析で野生型株（WT）の最大 4 倍の増加を確認した。産生される MV の TEM 観察から、WT が 100 nm 以上のサイズに対し *ΔdegP* 株は数 10 nm のものが多く、大きさの違いが示唆された。次いで *ΔdegP* 株で増加するタンパク質が MV に存在する S-layer protein (H328 株ゲノム中 *slpA*) と同定した。これを MV の足場にしてトリ羽毛分解に寄与する protein disulfide oxidoreductase (H328 株ゲノム中 *pdo7*)を融合させ、MV 表層へ提示させることで MV の質的改善の検討を行っている。

1) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **100**, 9837-9843 (2016) 2) *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **78**, 1623–1625 (2014) 3) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **82**, 941-950 (2009) 4) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **98**, 2973-2980 (2014)

Membrane vesicles (MVs) are of interest for various biotechnological applications[1)]. We found that MVs are exfoliated from the cell surface of *Meiothermus ruber* H328, a Gram-negative and thermophilic bacterial strain isolated at Arima Hot Spring, Kobe[2)]. The strain H328 was characterized by remarkable degradation of chicken feathers (main component: keratin)[3)] and its keratinolytic protease also occurs in MVs. To utilize MVs in the field of biotechnology, it is necessary to improve the quantity & quality of MV production in bacteria. We focused on the knockout of a chaperone gene *degP* and it resulted in the increase in MV production maximally by 4-fold. The size of MVs produced by *ΔdegP* strain was smaller than 100 nm observed for those by the wild type strain, indicating that the ability of MV production in the strain H328 is enhanced by the knockout but the increased MVs are suggested to be different in their size. Next we have focused on S-layer protein (*slpA*) and its fusion with the gene for protein disulfide oxidoreductase (*pdo7*). This challenge is underway but leads to the display of desired proteins on the surface of MVs by use of SlpA as a novel scaffold.

membrane vesicle, thermophile, feather degradation

講演番号：3FS-06
講演日時、会場：3 月 20 日 17:05～ ミーティングルーム F

膜小胞高生産性細菌 *Shewanella vesiculosa* HM13 における細胞外膜小胞生産の分子基盤

Molecular basis of biogenesis of extracellular membrane vesicles of a hypervesiculating bacterium, *Shewanella vesiculosa* HM13

○栗原 達夫（京大化研）
○Tatsuo Kurihara (Kyoto Univ.)

アジ腸内容物から分離されたグラム陰性細菌 *Shewanella vesiculosa* HM13 は、S 層タンパク質と推定される約 49 kDa のタンパク質 (P49) を主要な積荷とした細胞外膜小胞を高生産する。高純度の特定タンパク質を含む膜小胞を高生産する性質は、細胞外にタンパク質を生産するプラットフォームとして膜小胞を利用する研究や、機能性ナノ粒子として膜小胞を開発する研究に有用と考えられた。そこで、そのような応用展開も視野に入れて、本菌の膜小胞の形成機構、特に P49 が膜小胞に輸送される分子基盤の解析に取り組んだ。全ゲノム解析の結果、P49 遺伝子近傍にはⅡ型タンパク質分泌装置 (T2SS) のホモログや細胞表層糖鎖合成関連タンパク質のホモログをコードする遺伝子群が見いだされた。これらの遺伝子群の破壊実験や *in vitro* での P49 積み込み実験、細胞や膜小胞の表層糖鎖の解析により、P49 は T2SS に類似した分泌装置によって細胞表層に輸送された後、表層多糖との相互作用を介して膜小胞に積み込まれることが示唆された。一方、膜小胞生産性に影響を及ぼす因子についても解析を進めた。その結果、外膜とペプチドグリカンの架橋形成に関与するタンパク質や膜リン脂質生合成を担う酵素の欠損によって膜小胞生産性が向上することが示された。また、本菌の膜小胞生産性が環境中のアミノ酸濃度に応答して変化することを見いだし、その制御に関与するセンサータンパク質ホモログを同定した。

Shewanella vesiculosa HM13, a Gram-negative bacterium isolated from intestinal contents of a horse mackerel, abundantly produces extracellular membrane vesicles (EMVs) carrying a putative S-layer protein, P49, as a major cargo protein. We analyzed the EMV biogenesis mechanism of this bacterium, particularly the mechanism by which P49 is loaded onto EMVs. Whole genome sequencing revealed that there are genes coding for homologs of the components of the type II secretion system (T2SS) and proteins involved in the synthesis of surface polysaccharides in the vicinity of the P49 gene. Gene disruption experiments, *in vitro* P49 loading experiments, and analysis of the surface polysaccharides of the cells and EMVs suggested that P49 is translocated to the cell surface by the T2SS-like machinery and loaded onto EMVs through the interaction with the surface polysaccharides. On the other hand, through the analysis of the vesiculation mechanism, we found that the production of EMVs is enhanced by disrupting the outer membrane-peptidoglycan linkages and by altering membrane phospholipid composition. We also found that the EMV production is affected by environmental amino acid concentration and identified a putative sensor protein involved in this regulation.

membrane vesicle, protein secretion, polysaccharide

講演番号：3GS-01
講演日時、会場：3 月 20 日 15:00～ ミーティングルーム G

脂質代謝改善ペプチド
Lipid lowering peptides
○長岡 利（岐阜大学応用生物科学部）
○Satoshi Nagaoka (Gifu Univ.)

[1] コレステロール（CHOL）代謝改善ペプチド（ラクトスタチン：IIAEK）の標的分子の発見
我々は世界で最初に、牛乳 β-ラクトグロブリンより CHOL 代謝改善ペプチド、ラクトスタチンを発見した。小腸で IIAEK と相互作用する標的分子を同定するために、IIAEK を蛍光物質導入により可視化する新規分子プローブ IIXEK を化学合成した(1)。ラット腸粘膜及び脂質ラフト画分に対する IIXEK を用いた光親和性標識実験などにより、IIAEK と相互作用する標的分子として腸アルカリフォスファターゼ（IAP）を特定した(1)。驚くべきことに、IIAEK 添加により Caco-2 細胞の脂質ラフト画分の ALP 比活性は約 3 倍増加、IAP タンパク質レベルは顕著に増加した。また、Caco-2 細胞への IIAEK 添加により IAP 発現は有意に上昇し、ABCA1 発現は有意に低下した(1)。さらに、Caco-2 細胞への IAP siRNA 導入により、IIAEK 添加による ABCA1 mRNA レベルの有意な低下は消失した(1)。以上より、IIAEK は IAP を標的分子とし、IAP との直接的相互作用を介して、IAP の特異的活性化及び ABCA1 mRNA レベルの下方調節を伴って、CHOL 代謝改善作用を発揮する新規情報伝達系を発見した(1)。 (1) *Nutrients* 12, 2859 (2020)
[2] 新規 CHOL 代謝改善・抗肥満ジペプチド（FP：Phe-Pro）の発見
我々は世界で最初に、牛心臓加水分解物より CHOL 代謝改善作用と抗肥満作用の両方を発揮するジペプチド FP を発見した(2)。FP の作用はペプチド輸送担体 1（PepT1）欠損マウスでは消失した(2)。PepT1 は CHOL 代謝改善のための新規標的分子であることを発見した(2)。 (2) *Sci.Rep*. 9, 19416 (2019)

[1] Discovery of a target molecule for cholesterol-lowering peptide (lactostatin : IIAEK)
To identify target molecules that interact with IIAEK in the small intestine, we chemically synthesized a novel molecular probe, IIXEK, that visualizes IIAEK by introducing a fluorescent substance. Intestinal alkaline phosphatase (IAP) was identified as a target molecule that interacts with IIAEK. We found that IIAEK targets IAP to improve cholesterol metabolism via a novel signaling pathway involving the specific activation of IAP and downregulation of intestinal ABCA1.
[2] Discovery of a novel cholesterol-lowering and anti-obesity dipeptide (FP)
For the first time in the world, we discovered a dipeptide FP that exerts both cholesterol-lowering action and anti-obesity action from bovine heart hydrolysate. The effect of FP disappeared in peptide transporter 1 (PepT1) KO mice. PepT1 was discovered to be a novel target molecule for improvement of cholesterol metabolism.

peptide, lipid, alkaline phosphatase

講演番号：3GS-02
講演日時、会場：3 月 20 日 15:30～ ミーティングルーム G

消化管内分泌系への作用を介する糖代謝改善ペプチド
Dietary peptides module GLP-1 and glucose metabolism

○比良 徹（北大院農）
○Tohru Hira (Hokkaido Univ.)

消化管ホルモン Glucagon-like peptide-1 (GLP-1)は、食後に分泌が高まり、膵β細胞からのインスリン分泌を促進することで、食後血糖の調節に深く関与する。グルコース、脂肪酸に加え食品ペプチドやアミノ酸が GLP-1 分泌を促進する。GLP-1 は血液中で Dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4)により速やかに不活性化されることから、シタグリプチンなどの DPP-4 阻害薬が GLP-1 の不活性化を防ぐ目的で糖尿病治療に用いられている。食品ペプチドの中には、*in vitro* の試験で DPP-4 阻害作用を示すものが複数報告されているが、*in vivo* での作用は明らかではない。演者らは、DPP-4 阻害薬および DPP-4 欠損モデル動物を用いて、食品タンパク質の経口投与が GLP-1 分泌促進に加えて、DPP-4 活性を抑制する可能性を検討した。

デキストリンの経口投与に対する GLP-1 応答（血中濃度上昇）は、正常ラットに比べて DPP-4 阻害薬投与ラットにおいて顕著に増大した。このことは、デキストリン（グルコース）刺激によって放出された GLP-1 は DPP-4 により速やかに分解されることを示している。一方、ホエイタンパク質経口投与に対する GLP-1 応答は DPP-4 阻害剤投与の影響を受けなかった。DPP-4 欠損モデルにおいても同様の結果が得られた。これらの結果から、食品タンパク質の経口摂取により生じたペプチドが血中の DPP-4 活性を抑制することで、栄養素刺激により放出された GLP-1 の分解を防ぐ作用があることが示唆された。

Glucose is the best-known nutrient to stimulate glucagon-like peptide-1 (GLP-1) secretion, but dietary peptides also potently stimulate GLP-1 secretion. We hypothesized that dietary peptides protect GLP-1 from degradation through attenuating DPP-4 activity in vivo. We compared GLP-1 responses with a dietary protein, a carbohydrate in rats having or not having plasma DPP-4 activity. Experimental results suggest that GLP-1 released by dextrin was immediately degraded by DPP-4, while GLP-1 released by whey protein was less degraded.

Shimizu Y, Hara H, Hira T. Glucagon-like peptide-1 response to whey protein is less diminished by dipeptidyl peptidase-4 in comparison with responses to dextrin, a lipid and casein in rats. *Br J Nutr.* 2020 Jul 27;1-10.

Dietary peptides, GLP-1, DPP-4

講演番号：3GS-03
講演日時、会場：3 月 20 日 16:00～ ミーティングルーム G

食品ペプチドの修飾と機能

Biological activities of modified peptides in food

○佐藤 健司（京都大院農）
○Kenji Sato (Kyoto Univ.)

この枠線内に要旨を上書き入力してください
食品タンパク質の酵素分解物および発酵物中のペプチドの摂取により従来のアミノ酸源として以上の有益な作用が報告されている。そのため食品タンパク質の中に隠れている活性ペプチドが体内外の消化により遊離してくるとしばしば記載されている。食品中のペプチドが標的組織に到達するためにはエンド型プロテイナーゼの他、エクソ型ペプチドアーゼによる消化に抵抗性を持つ必要がある。これまでにいくつかのプロリンジ・トリペプチドがペプチダーゼに対して抵抗性を持ち、体内に吸収されることが示されている。他の生体へ移行するペプチドの候補としてペプチダーゼ抵抗ペプチドを同定したところ、ピログルタミン酸ペプチドおよびアミノ末端のアスパラギン酸残基が D-型または β-ペプチド結合を持つペプチドが見出された。これらの修飾ペプチドは経口摂取後、ヒト、または動物の体内で有意に増加することが示されている、また pyroGlu-Leu, β-Asp-Leu 等は動物実験でホストの抗菌ペプチド分泌促進、疲労回復効果などの有益な働きを示すことが明らかになっている。そのため、食品中の単なるタンパク質の分解物ではなく、加工中、または消化吸収中に修飾を受けたペプチドも有意な生理機能を示すことが明らかになった。

Type your abstract here.
It has been demonstrated that oral administration of food protein hydrolysate and fermented products exert beneficial activities beyond conventional nutritional activity. It has been frequently mentioned that bioactive peptides encrypted in inactive parent protein are released by proteolysis during food processing and digestion. The peptide must resist exopeptidase digestion and reach target organ to exert special activities. It has been demonstrated that some prolyl di- and tri-peptides are absorbed into blood system and exert significant biological activities. In addition to prolyl peptides, pyroglutamyl peptides and D/L-β-asparatic and D-α-asparatic peptides were identified in exopeptidase digests of food protein hydrolysates. These modified peptides were demonstrated to be absorbed into blood stream and exert beneficial activities; such as enhance innate immunity, anti-fatigue activity, and so on. These facts indicate that not only simple fragment of parent protein, but modified peptides generated during processing and digestion are also responsible for biological response upon ingestion.

pyroglutamyl peptide, modified peptide, isopeptide

講演番号：3GS-04
講演日時、会場：3 月 20 日 16:30～ ミーティングルーム G

ペプチドの新規送達戦略と配列機能解析

Strategy for intestine delivery of peptide optimized by sequence function correlation

○本多 裕之（名古屋大学大学院工学研究科）
○Hiroyuki Honda (Nagoya Univ.)

我々は、Fmoc 固相合成法を用いたスポット合成ペプチドアレイによる中長鎖の生理活性ペプチドの探索を行ってきた。探索したペプチドの残基置換ライブラリーを評価し、ペプチドの配列機能解析を行い、別途用意した可食性タンパク質由来のペプチドデータベースにあてることで、生理活性食品ペプチドを特定することができる。さらに、最近、それら中長鎖ペプチドを経口飲用摂取し、胃での加水分解を防ぎ、機能保持したまま腸送達する方法を開発したので紹介する。

高温焼成多孔性シリカゲル担体を用いた特定ペプチドの腸送達（*J. Biosci. Bioeng.*, 128, 44-49 (2019)）食品添加物として認可を受けているシリカゲル粉末のメーカーと共同で、ペプチドの経口摂取に適した多孔性シリカゲル担体を開発した。32 種類のペプチドを合成して、pH に対する吸着性能を調べたところ、シリカゲルを高温焼成することで吸着特性が大きく変わり“酸性かつ弱い疎水性をもつペプチドを、胃の酸性条件化で吸着し、腸の中性条件下で著量放出できる”という特性を示した。これは、シリカゲル表面のシラノール基個数を制御し、酸性条件下でペプチド吸着を増大させたことによる。この結果、ペプチドにプロテアーゼ加水分解抵抗性を付与でき、無傷で腸に送達できる。

新規シリカゲル担体を用いた苦味ペプチドの除去（*Food Sci. Technol. Res.*, 25, 179-186 (2019)）　タンパク質加水分解物中の疎水性塩基性ペプチドは苦味を呈する。活性炭は選択性が全くないが、上記担体は pH7 でこれら苦味ペプチドを選択吸着するため、実際に呈味が改善した。

機械学習を用いた生理活性ペプチドの探索　ペプチドの生理機能と配列の関係性を明らかにすることは重要である。機械学習にはランダムフォレストを使った多変量解析が有効である（*ACS Biomater. Sci. Eng.*, 6, 11, 6117–6125 (2020)）。そこで、460 種の 6 残基ランダムライブラリーで胆汁酸結合活性を調べ、機械学習モデルを構築した。710 種の可食性タンパク質由来の 6 残基ペプチド 98387 種を評価したところ、腸送達可能でかつ活性をもつと予測される 6 種の食品ペプチドの特定に成功し、実際にペプチド合成しで胆汁酸ミセル崩壊活性を評価したところ、既往のソイスタチン（VAWWMY）と同様の崩壊活性を示した。そのうちの 1 種はサーモライシン処理で切り出せる食品ペプチドであった。

To identify bioactive peptides in edible proteins and implement their intake by oral administration, both sequence function correlation and investigation of new strategy on intestine delivery are necessary. We will report the three topics, 1) heat treated-porous silica beads for intestine delivery, 2) selective remove of bitter peptides by the silica beads, and 3) machine-learning screening of bioactive peptide from edible protein.

sequence function correlation, intestine delivery, food peptide

講演番号：3GS-05
講演日時、会場：3 月 20 日 17:00～ ミーティングルーム G

脳移行ペプチド
Small peptides crossing blood-brain barrier

○松井 利郎（九州大農）
○TOSHIRO MATSUI (Kyushu Univ.)

ペプチドあるいはタンパク質分解物の摂取によってヒトあるいは老化促進マウスでの記憶力や認知機能低下が抑制されるなど、ペプチド摂取による脳機能改善報告が近年蓄積されつつある。他方、ペプチドがそのままの形で血液脳関門（Blood-Brain Barrier：BBB）を透過し、脳実質へ移行、蓄積するかどうかについては十分な知見が得られていない。本講演では、BBB を透過可能なペプチドについて、これまでに報告されている知見をもとに議論する。

当研究室で行った雄性 ICR マウス脳灌流試験（流速 2.0 mL/min、200 nmol/mL）によると、脳移行性があるとされる[$^{13}C_2$,^{15}N]Gly-Sar（*N*-methyl-Gly）が 2 min の灌流によって脳血管を除去した実質より LC-MS 検出され、クリアランス値 K_i は 7.60 μL/g-brain·min であった。Gly-Sar を基本骨格として合成したジペプチドでは Gly-Pro および[$^{13}C_5$,^{15}N]Tyr-Pro（K_i: Gly-Pro, 3.49; Tyr-Pro, 3.53 μL/g-brain·min）の有意な脳移行性が確認されたが、その他のジペプチドでは移行は認められていない。BBB 透過ジペプチドとしては C 末端側 Pro の存在が重要のようであるが、配列-透過の相関についてはさらなる検討が必要である。また、ペプチドの脳移行に関するクリアランス研究は先行例がなく比較検証が困難であるが、GABA トランスアミラーゼ阻害薬であるバルプロ酸やパーキンソン病治療薬であるアマンタジンと比較すると、ジペプチドの脳移行性は薬剤の 1/30 以下である。移行量の低さ、蓄積・作用部位・薬効性に関するエビデンスの提示、さらには脳移行の実証が脳でのペプチド機能を明示する上で最重要課題であり、今後の研究進展が待たれる。

Refs) T. Matsui, *et al., Food Prod. Proc. Nutr.*, in press; M. Tanaka, *et al., Sci. Rep.*, **9**, 5769 (2019); M. Tanaka, *et al., npj Sci. Food*, **4**, 7 (2020).

There have been few evidential *in vivo* studies that peptides can cross the blood-brain barrier (BBB) in their intact forms. In this symposium we thus discuss BBB transportable peptides from the aspect of pharmacokinetics and sequences in *in situ* mouse perfusion experiments at a rate of 2.0 mL/min for 0–10 min. By LC-TOF/MS analysis, a significant influx of [$^{13}C_2$,^{15}N]Gly-Sar (K_i: 7.60 μL/g·min) into the brain parenchyma was obtained. Among the synthetic dipeptides based on the Gly-Sar skeleton, we found that Gly-Pro and Tyr-Pro can cross the BBB with K_i values of 3.49 and 3.53 μL/g·min, respectively. This study provides the first evidence that Gly-Pro and Tyr-Pro, as well as dipeptidic Gly-Sar can transport across the BBB in their intact forms. It seems likely that Pro positioned at the C-terminal in dipeptide is required for BBB transport of dipeptides.

Blood-brain barrier, peptide, transport

講演番号：3HS-01
講演日時、会場：3 月 20 日 15:05～ ミーティングルーム H

超ハイスループットな微生物の単離を可能とするマイクロデバイス

High throughput cell culturing micro device for microorganisms analysis

○佐々 文洋 (九州大学)
○Fumihiro Sassa (Kyushu Univ.)

こ現在の微生物学研究で用いられている培養機器の基本構造の多くはコッホやパスツールツールの時代に開発されたものであり、改良の余地を多く残している。培養分析を行う際には、扱う培地・溶液の容量は多くの場合 mL オーダーであり、1 - 100 細胞程度の微小な代謝では分析に十分な代謝物濃度を得ることができない。また、これらのツールを用いて一人の実験者が同時に分離・培養し、分析できる微生物は数 10～数 100 個程度に限定される。本年度より発足した新学術領域「ポストコッホ機能生態学」で目指す、一つの生態系の微生物種とその生理的機能の多様性の網羅的解明のためには、従来とは桁違いの数のサンプルを処理可能な微生物分離・培養・解析システムの構築が必要である。講演者らはこれまでに、半導体製造で用いられる微細加工技術を取り入れることで、ナノリットルスケールでの培養と微小コロニーの長期観察が可能な微生物用のマイクロ培養デバイスを開発してきた。これは一回の操作で数万の細菌の同時独立培養、や生体情報（千本単位のグロースカーブなど）の一括取得に成功している。
本講演ではこれまでに開発してきた微生物培養マイクロデバイスとその解析方法・結果、及びポストコッホ機能生態学で今後行うデバイス開発の展望について述べる。

Basic structure of most tools for microorganisms culture was developed in age of Koch and Pasteur. In culturing and analysis with these tools, typically mL order of medium or solution was used. It is difficult to obtain enough concentration of metabolite from small number of bacterial cells with such amount of medium. And more, the number of analysis, isolation and culturing by human hand with the tools is limited to several hundred per day. Drastically larger number of analysis from conventional methods were required for the project “Post-Koch Ecology” which aimed to entire analysis of a ecosystem.
We have developed a micro device for high density bacterial culturing and analysis which can be culture 100,00 order of isolated bacteria with a 3-inch device by employing micro fabrication technique.
In this talk, we show developing the high-density bacterial culturing micro devices and results from the device and discuss plan for device development in the project “Post-Koch Ecology”.

Cell culturing micro array device, Microorganisms, Screening

講演番号：3HS-02
講演日時、会場：3 月 20 日 15:30～ ミーティングルーム H

培養アプローチで迫る稀少微生物たちの実体

Exploration and mining of previously uncultured microorganisms in the environment

○中井 亮佑[1]、草田 裕之[1]、玉木 秀幸[1,2,3] ([1]産総研・生物プロセス、[2]筑波大・生命環境、[3]東京大・生セ)
○Ryosuke Nakai[1], Hiroyuki Kusada[1], Hideyuki Tamaki[1,2,3] ([1]AIST, [2]Univ. Tsukuba, [3]Univ. Tokyo)

DNA 解析技術の革新が環境微生物の“超”多様性を導く一方で、21 世紀を迎えてなお、自然界に存在する微生物の圧倒的大多数が培養困難である。令和元年度より発足した新学術領域で目指す微生物を基盤とした「ポストコッホ機能生態学」を創成するためには、ボトルネックたる難培養性微生物の実体解明が必要である。講演者らは、培養頻度のきわめて低い稀少微生物を単離する趣向を凝らした培養技術を研究してきた。例えば、古典的寒天プレート培養法の再考、すなわち培地の支持体・成分・調製法の検討に取り組み、一例を挙げると、培地調製法の改良によって稀少系統 *Gemmatimonadetes* 門細菌のコロニー形成が改善されることを実証した。また、精密ろ過フィルターによるサイズ選別を活用しながら、極小アクチノバクテリア（*Aurantimicrobium* 属細菌）や高次分類基準で新しい *Oligoflexia* 新綱細菌（後に *Bdellovibrionota* 新門へ再編）を単離した。これらの研究により、稀少微生物の少なくとも一部が超微小な細胞サイズを有することを見出した。本講演では、一見地味ではあるが、稀少微生物の可培養化に繋がった“培養のコツ”を概観するとともに、ポストコッホ技術との分野横断的融合が生み出す新たな可能性、そして今後の展望を述べたい。

The advent of high-throughput metagenomics technology has greatly expanded our knowledge of microbial diversity. However, the majority of environmental microorganisms have not grown in the laboratory, even in this revolutionized sequencing era. To explore such “microbial dark matter,” we have developed novel strategies to isolate and cultivate previously uncultured microorganisms. To date, we have improved traditional agar plating methods, and one of our previous studies has demonstrated that a simple modification in media preparation can improve the colony-formation ability of microorganisms, including members of the rarely cultured phylum *Gemmatimonadetes*. We have also succeeded in recovering and culturing some fastidious bacteria (e.g., members of the novel phylum *Bdellovibrionota*) through size-selective filtration. In this talk, we will review the “cultivation tips” found through these previous trials, and discuss about the promise of innovative cultivation approaches targeted in the scientific project “Post-Koch Ecology: The next-era microbial ecology that elucidates the super-terrestrial organism system.”

microbial diversity, uncultured bacteria, isolation

講演番号：3HS-03
講演日時、会場：3 月 20 日 15:55～ ミーティングルーム H

分離培養手法の革新に向けて：さみしがり屋だけど人込みは嫌い

Toward innovation for microbial cultivation: escaping from loneliness but not to be crowded

○青井 議輝 (広島大統合生命)
○Yoshiteru Aoi (Hiroshima Univ.)

なぜ多くの微生物は培養できないのか？普遍的な理由は存在するのか？微生物学的な常識に照らせば「培地組成など培養条件が適合しない」こと（だけ）が難培養性の原因だと考えること自体は極めて妥当である。しかし一方で、我々の研究グループでは、そのような「培養条件の不適合性」以外に、まだ十分に検討されていない、「普遍的に環境微生物の難培養性をコントロールするメカニズム」が存在すると仮定し、難培養性を制御するメカニズムの解明とそれに基づく新規分離培養手法の開発を検討している。

本講演では、１）微生物間相互作用による増殖不能状態の微生物の回復と培養化および、２）自己増殖阻害（液体培養でのみ増殖可能な微生物など）に着目した、難培養性微生物の増殖制御メカニズムおよび分離培養手法の開発状況について紹介する。また「難培養性微生物とは何か」という課題について議論する。

Answering to the question, reason why majority of microorganism, is not simple, because it is natural or rather common sense to think that diverse microbial types require each different condition for growth such as culture medium composition. Thus, this can be a (solo) reason for the microbial uncultivability. However, besides “unfitness to the culture condition” our group have been focusing on unidentified mechanisms controlling growth of uncultivable microorganisms which are not easy to cultivate by conventional approaches.

In this session, I will talk about our recent challenges on development of new cultivation methods and clarification of mechanisms controlling growth of environmental microorganisms, by focusing on 1) resuscitation from dormancy, especially microbial interactions controlling microbial growth initiation, and 2) self-growth inhibition such as a microbial type which does not form colonies on solid media.

microbial uncultivability, resuscitation from dormancy, new cultivation techniques

講演番号：3HS-04
講演日時、会場：3 月 20 日 16:25～ ミーティングルーム H

Water-in-oil ドロップレットを用いたハイスループット微生物培養技術の開発と応用

Development of high-throughput cultivation method for microorganisms using water-in-oil droplets

○野田 尚宏（産総研バイオメディカル）
○Naohiro Noda (AIST)

Water-in-oil (w/o) ドロップレットは酵素反応のスクリーニング系、シングルセルゲノミクス、デジタル PCR など様々な分野で利用されるようになってきている。マイクロ流路を用いることで 10 万個以上のドロップレットを簡単に作製することができるため、微生物のハイスループットな培養場としても利用されている。本研究では w/o ドロップレットを用いて微生物を区画化・培養・回収する一連のプラットフォーム構築を目指した。そのための鍵となる技術として、内部で微生物が増殖したドロップレットを蛍光により選択的に回収する技術の開発を行った。微生物増殖の検出のために、RNase の活性によって切断されることで蛍光を発する RNA プローブを用いた。ドロップレットの中で増殖した微生物が放出する RNase により蛍光が発せられ、微生物の増殖が識別可能となるという原理である。大腸菌等の微生物をモデルとして直径 120 マイクロメートル程度の w/o ドロップレットに封入した。数日の培養後に個々のドロップレットの蛍光を評価したところ、大腸菌の増殖が見られたドロップレットを蛍光値から容易に区別し、回収することができた。本手法を土壌の環境微生物に適用した結果、微生物が増殖したドロップレットの回収に成功した。

Water-in-oil (w / o) droplets technique has been used in various fields such as single cell genomics and digital PCR. It is also used as a high-throughput culture technique for microorganisms. We aimed to construct a platform involved in compartmentalization, culture, and isolation for microorganisms using w/o droplets. We have developed a technology to detect and sort droplets in which microorganisms have grown using an RNA probe that fluoresces when cleaved by RNase. *Escherichia coli* was used as a model microorganism and encapsulated into w/o droplets. The droplets, in which *E. coli* grew, could be easily distinguished by the fluorescence intensity. Using the w/o droplets and fluorescent probe technique, we tried the isolation of microorganisms in a soil sample, and successfully collected the droplets, in which the microorganisms grew.

w/o droplets, FNAP, High-throughput cultivation method

講演番号：3HS-05
講演日時、会場：3 月 20 日 16:50～ ミーティングルーム H

ハイスループット電極微生物培養は電気細菌の普遍性を示せるか？

High-throughput electrode microbial cultivation may answer the ubiquity of electric bacteira

○岡本 章玄[1,2] ([1]物材研、[2]北大理)
○akihiro okamoto[1,2] ([1]NIMS, [2]Hokkaido Univ.)

近年、電気細菌や発電細菌と呼ばれる細胞外固体と直接電子のやり取り「細胞外電子移動（Extracellular Electron Transport, EET)」を行い代謝する細菌が特に熱水噴出孔などの深海生態系において注目されており、電気培養によって未分離の細菌を集積・単離する試みが盛んに行われている。「電極培養」とは、培養液に浸した電極によって代謝を駆動し、細菌を培養する方法を指し、これによって EET を行う電気細菌が電極表面に集積されることが期待できる。我々は、電気細菌の普遍性に興味があり、堆積物から糞便まで様々な環境に由来する微生物群衆の電気培養を行なってきた。しかし、集積されたのが全て電気細菌とも限らないために、環境中においてどれだけの細菌が EET を行うのかと言った基本的な問いにも答えることが出来ていない。本発表では、この問いに答えるためにこれまで行なってきた微生物単離や鍵酵素であるマルチヘムシトクロム遺伝子解析を含む研究内容を紹介する。加えて、現在独自に開発を進めている１細菌に分離してから電極培養するハイスループット電気微生物培養法に関しても議論をおこなう予定である。

In recent years, electric bacteria capable of exchange electrons directly with extracellular solids for driving their metabolism, referred as extracellular electron transport (EET), have attracted attention, especially in deep-sea ecosystems such as hydrothermal vents. The term "electrode cultivation" refers to a method of culturing bacteria by driving their metabolism with electrodes immersed in a culture medium, which accumulates EET-capable bacteria on the electrode surface. We have been interested in the ubiquity of electric bacteria and have conducted electrode cultivation of microbial communities from various environments, from sediments to feces. However, we have not yet been able to answer even the basic question of how many bacteria perform EET in the environment, because not all of the accumulated bacteria are electrogenic. In this presentation, we will introduce the research we have conducted so far to answer this question, including microbial isolation and gene analysis on the key enzyme of multi heme *c*-type cytochrome for EET. Also, we will discuss the high-throughput electro-microbial cultivation method that we are currently developing, which is a method of separating bacteria into single cells and then culturing them on electrodes.

Extracellular electron transport, Outermembrane cytochrome, Anaerobic respiration

講演番号：3IS-01
講演日時、会場：3 月 20 日 15:05～ ミーティングルーム I

単細胞生物にとって死とは何か？

Why are cells mortal?

○吉田 知史（早稲田大国際）
○Satoshi Yoshida (Waseda Univ.)

あらゆる生命にとって死は不可避である。しかし細胞死が起こる条件というのは未だにきちんと理解されていない。これまで単細胞生物である出芽酵母にとって細胞死は老化あるいは過剰なストレスの結果、副次的に引き起こされる現象だと見なされてきた。しかし最近、分裂酵母や大腸菌など対象分裂を続ける単細胞生物では細胞老化現象が見られないものの一定の割合で細胞が死ぬ「自然死」が起こっていることが報告されている。本講演では「死」いう現象を改めて定義するために単細胞生物にとっての細胞死をもう一度考察しなおす。単細胞生物にとっての死を考察することで生命というシステムが死を避けるためにいかにその恒常性を保つシステムを進化させてきたのかを議論したい。

All life is mortal. However, the conditions under which cell death occurs are still not properly understood. For asymmetrically dividing budding yeast, cell death has been regarded as a secondary phenomenon caused by aging or excessive stress. Recently, however, it has been reported that a certain percentage of cells in fission yeast, E. coli, and other unicellular organisms that proliferate in a symmetric cell division still undergo "natural death," although there is no evidence of cellular senescence. In this talk, We will discuss the phenomenon of cell death in unicellular organisms in order to redefine the term "death". We will discuss how the living system has evolved to maintain homeostasis in order to avoid death.

Yeast, Cell death, Ageing

講演番号：3IS-02
講演日時、会場：3 月 20 日 15:30～ ミーティングルーム I

細胞内 ATP 濃度と細胞死の関係

The relationship between ATP homeostasis failure and spontaneous cell death

○高稲 正勝（群馬大未来先端）
○Masakatsu Takaine (Gunma Univ.)

生きている細胞は自由エネルギーを消費して代謝活性を恒常的に維持している。一方で大腸菌や酵母は富栄養かつ非ストレス下においても一定の確率で自然死する。自然死の原因や過程の詳細は未だ不明である。演者は酵母の一細胞レベルの細胞内 ATP 濃度の解析から、野生型酵母株では ATP 濃度を一定に保つ頑健な仕組み（ATP 恒常性）が存在することを明らかにしてきた。また、ATP 恒常性が部分的に破綻して、細胞内 ATP 濃度が低下かつ不安定になる遺伝子変異株も複数同定している。そこで「ATP 恒常性の偶発的な機能不全が代謝全般の同時破綻を招き、細胞の自然死を誘導する」という仮説を立てた。今後は①代謝制御因子群を同定し、②自然死に先立ってどのような代謝変化が起こるかを解析したいと考えている。本発表ではその具体的な取り組みついて紹介したい。

Living cells consume chemical free energy to constantly maintain metabolic activity. On the other hand, *Escherichia coli* and yeasts die spontaneously with a certain probability even under eutrophic and non-stress conditions. Details of the causes and processes of natural death are still unknown. From the analysis of the intracellular ATP concentration at the single cell level of yeast, I have clarified that the wild-type yeast cells have a robust mechanism that keeps their ATP levels constant, *i.e.* ATP homeostasis. In addition, we have identified several mutant strains in which ATP homeostasis is partially disrupted and intracellular ATP concentration decreases and becomes unstable. I hypothesized that accidental dysfunction of ATP homeostasis leads to simultaneous disruption of cellular metabolisms and induces natural cell death. In the future, I would like to (1) identify the metabolic control factors and (2) analyze what kind of metabolic changes occur prior to the spontaneous death.

ATP, yeast, cell death

講演番号：3IS-03
講演日時、会場：3 月 20 日 15:55～ ミーティングルーム I

Microfluidics for imaging cell deaths in fission yeast
○Hidenori Nakaoka (Kyoto Univ.)

Although a population of cells readily grow in appropriate environments in the laboratories, we empirically know that they are not necessarily immortal at the level of single cells. The rare death in stress-free environments, which we define “intrinsic death”, is a fundamental biological phenomenon because it is a manifestation of a limitation in the homeostatic regulation of the cellular systems. Not much attention, however, has been paid to the intrinsic death, partly due to technical difficulties in detection of the death events; the death rate is typically much smaller than the population proliferation rate, and an exponential increase in the number of cells in the population obscures the rare events.

To overcome the issue, we developed a microdevice in which cell divisions and deaths of more than 1,000 old-pole cell lineages can be tracked under a controlled external environment. By examining survival curves of the lineages constructed from long-term time-lapse data, the intrinsic death rates in several commonly employed culture conditions were estimated to be two orders of magnitude smaller than the division rates in those environments. Furthermore, we found a positive correlation between the division and death rates, a relationship that has not previously been well characterized. Interestingly, we observed synchronous cell deaths of progenies (typically 6 to 8 cells) of a single ancestor cell in more than 80% of the death cases, which implies that even after a death trigger event (whose molecular detail is still unknown) occurs, cells are allowed to undergo a couple of cell divisions before the collapse in cell wall and membrane integrity. We are currently investigating molecular events and physiological changes associated with the process of the intrinsic death to reveal the upstream death triggers.

cell death, microfluidics, fission yeast

講演番号：3IS-04
講演日時、会場：3 月 20 日 16:20～ ミーティングルーム I

栄養飢餓による微生物細胞の死

Microbial cell death by nutrient starvation

○加藤 節（広島大院統合生命）
○Setsu Kato (Hiroshima Univ.)

微生物の細胞は、そのゲノム情報が同一であっても異なる表現型を示す場合があることが知られている。このような表現型の多様性は、微生物の生存曲線においても見出すことができる。酵母や大腸菌のような微生物は栄養飢餓に陥ると細胞分裂を停止する。これらの細胞は一定期間生き延びたのちに死滅していく。この時、興味深いことにすべての細胞が同時に死ぬわけではなく、一部の細胞から先に死んでいく。遺伝的に同一な細胞集団の中で、どうしてこのような多様性が生まれるのだろうか。早死にする細胞と長生きする細胞は何が違うのだろうか。そこで、死ぬ細胞の特徴を明らかにするため、出芽酵母をモデルとして細胞の死にゆく過程を経時観察することにした。最少培地において定常期まで培養した細胞を死細胞染色試薬である Propidium Iodide (PI) を加えたならし培地上で培養し、タイムラプス観察を行った。その結果、出芽酵母の細胞は PI により染色されるタイミングとほぼ同時に収縮し、平均しておよそ 22%サイズが小さくなる現象を発見した。この時、収縮前の細胞サイズは細胞死が起こる確率には影響を与えないことが明らかとなった。一方で、タイムラプス観察中に生存し続けた細胞はわずかながらもサイズが大きくなる様子が観察された。現在はこれらの現象が異なる株や異なる培養条件においても観察されるかどうかを解析している。以上の結果を合わせ、出芽酵母の細胞が死ぬときに起こる現象とその普遍性について議論したい。

Cells display varying behavior even though they originate from a clonal population. Such diversity was also observed in cell survival under nutrient starvation conditions in cultures of microbial cells, such as *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *S. cerevisiae* is a model organism for aging and longevity studies. Many genes are identified that extend or shorten life span in cell populations, yet we know little of the causes of death at a single-cell level. To understand the cause and process of cell death in *S. cerevisiae*, we performed time-lapse imaging and examined relationships between cell size and death. Surprisingly, our analysis showed that 1) most dying cells shrank with the same timing as propidium iodide staining, resulting in the accumulation of small dead cells in the culture and 2) cell size did not predict cell death. This observation identifies a representative phenotype of cell death and will assist in the investigation of diversity in cell survival.

Budding yeast, Cell death, Stationary phase

講演番号：3IS-05
講演日時、会場：3 月 20 日 16:45～ ミーティングルーム I

突然死を抑制する仕組みが細胞老化をもたらす

Suppression of sudden cell death leads to cellular senescence.

○松浦 彰（千葉大理）
○Akira Matsuura (Chiba Univ.)

細胞周期チェックポイントシステムは、増殖への障害となりうる異常が生じた際にその異常を検知し細胞周期回転を一時的に停止させ、異常を除去したのちに分裂を再開することを可能にする真核生物普遍的な仕組みである。チェックポイントシステムは細胞周期回転の停止を導く過程である一方、多くの場合タンパク質を始めとした構成因子の生合成による細胞成長には影響を与えない。我々は、染色体末端に存在するテロメアが徐々に短縮することで誘導される分裂能力低下現象、いわゆる分裂老化、の出芽酵母モデルを解析している過程で、DNA 損傷チェックポイントが最初に活性化されてから細胞分裂の永続的停止が起きるまでに複数回細胞分裂が行われていることを見出した。チェックポイントの活性化から分裂停止までの期間（老化前段階）では、細胞分裂の遅延によって細胞体積の増大が起きており、その期間の長さが体積増大の程度と逆相関したことから、最終的な分裂停止は細胞の肥大によりもたらされる機能低下が原因であることが示唆された。この結果は、その都度克服可能な弱いストレスであっても、それが慢性的に続くことで細胞が分裂不能な状態へと陥ることを示している。すなわち、異常を持ったまま分裂することで起こる突然死を防ぐための優れた仕組みが正常に作動することが、老化を直接的に引き起こしていると言えそうである。

The cell cycle checkpoint system is a universal mechanism in eukaryotes that allows continuous proliferation by temporarily inhibiting the division of unrepaired, damaged cells. As cell cycle checkpoints regulate cell cycling but not cell growth, cessation of cell division by the activation of checkpoint leads to an increase in cell volume. Using a *Saccharomyces cerevisiae* model of telomere shortening-induced replicative senescence, we have shown that loss of replication capacity in senescent cells is an indirect consequence of the delay in cell division by the DNA damage checkpoint. The results suggest that even weak, overcomeable stress becomes chronic and causes cells to be unable to divide. In other words, the normal operation of an excellent surveillance mechanism to prevent sudden cell death, which occurs when cells divide in an abnormal state, seems to be a direct cause of senescence.

cellular senescence, cell death, cell cycle checkpoint

講演番号：3JS-01
講演日時、会場：3 月 20 日 15:00～ ミーティングルーム J

メタボロミクスを実施する上での重要ポイント
Important points for implementing metabolomics

○馬場 健史（九大生医研）
○Takeshi Bamba (MIB, Kyushu Univ.)

メタボロミクス（メタボローム解析）は，代謝物の総体であるメタボロームを解析する学問分野である．各種生物の代謝物や食品などに含まれる低分子成分の変化を包括的に分析し，それらをもとにした成分のプロファイルにより生物の表現型や食品の品質を高解像度で示すことが可能である．すなわち，メタボロミクスは，見た目には現れない微細な生体内変動の解析，おいしさなどの複雑な成分の組み合わせにより表現される形質の解析などに有用であり，高解像度の表現型解析手段として幅広い分野での利用が期待されている．

メタボロミクスにおいては，サンプル調製，機器分析，データ解析の 3 つが重要工程になる．それぞれにおいてメタボロミクス独特の手法を用いるため，実際にメタボロミクスを実施するためには目的に応じて好適な手法を選択する必要がある．また，信頼性の高い解析を行うためには，それぞれの手法を良く理解し効果的に組み合わせたシステムを構成し運用することが重要になる．本講演では，メタボロミクスを実施する上での重要ポイントについて解説する．

Lately, several analytical techniques for metabolomics have been developed and they have been applied in various fields, such as medicine, food, and the environment. However, metabolomics suffers from remaining problems, such as reproducibility and inefficiency (resulting from sample preparation, analytical instrument conditions, and data-processing methods), because of the poor understanding of how these three subject fields are linked. Additionally, metabolomics is mainly performed using three processes: sample preparation, instrumental analysis, and data mining, and the metabolomics technologies related to these processes are specific and very complicated.

Many researchers, including our group, have been working on the development of various metabolomics technologies for more than 10 years. However, there remains room for improvement in the coverage of metabolites, quantitative performance, reproducibility, differences between experimental errors in different batches, etc.. Therefore, further improvements in analytical and data-mining techniques are needed to develop a more general and global approach to metabolomics. In this session, I will introduce current metabolomics technologies and I will also discuss important technology that is essential for next-generation metabolomics.

metabolomics, metabolome analysis

講演番号：3JS-02
講演日時、会場：3 月 20 日 15:25～ ミーティングルーム J

試料調製，サンプリングのプロトコル
Protocols for sample preparation and sampling

○平山 明由（慶大先端生命研）
○Akiyoshi HIRAYAMA (Keio Univ.)

メタボロミクスにおいて、適切なサンプリングを実施できるかどうかは、解析全体の成否を決定する上で重要な要素の一つである。しかしながら、特に臨床検体の場合は外部で採取される場合も多く、それらがどのように採取されたのか知りえない場合も多いと思う。

血液や尿中に存在する代謝物は、食事や運動の影響を受けてその濃度が変動することは良く知られており、さらには日内変動もあることから採取する時間にも気を付ける必要がある。また血液の場合は、使用する採血管の種類、採血後の処理の工程、検体の保管状態などの違いによって一部の代謝物の濃度が変化することも知られている。

本講演では、メタボロミクスで最も多く解析されている血液と尿の場合を例として、適切なサンプリングや前処理のポイントを紹介したい。

In metabolomics, performing proper sampling is one of the important factors in determining the success or failure of the entire analysis. However, especially in the case of clinical samples, they are often collected externally, and it is unknown how they were collected.

It is well known that the concentration of metabolites present in blood and urine fluctuates under the influence of diet and exercise. Furthermore, since there are diurnal fluctuations, it is necessary to pay attention to the collection time. In the case of blood, it is also known that the concentration of some metabolites changes depending on the type of blood collection tube used, the processing process after blood collection, and the storage condition of the sample.

In this talk, I would like to introduce the points of appropriate sampling and pretreatment in metabolomics.

metabolomics, sampling, preparation

講演番号：3JS-03
講演日時、会場：3 月 20 日 15:50～ ミーティングルーム J

親水性代謝物のワイドターゲットメタボローム分析のプロトコル

Protocol for widely-targeted hydrophilic metabolome analysis

○和泉 自泰（九大生医研）
○Yoshihiro Izumi (Kyushu Univ.)

解糖系，クエン酸回路，アミノ酸代謝，核酸代謝など，生命活動を担う主幹代謝経路の中間代謝物は，高極性のイオン性代謝物である．これらの代謝物を精確にプロファイルすることは，生命システムの理解に大きく貢献しうる．しかし，親水性代謝物は極性，電荷特性，分子量といった物性の範囲が幅広いため，単一手法での包括的測定には至っておらず，第一選択となる分析法の開発は未だ発展途上の段階である．近年、我々のグループでは 1～3 級アミンおよび 4 級アンモニウム基を修飾したメタクリレートポリマー粒子を充填した新規カラム（昭和電工マテリアルズ・テクノサービス株式会社）を設計し，親水性相互作用と陰イオン交換作用を連続的に組み合わせた親水性相互作用/陰イオン交換クロマトグラフィータンデム質量分析法（unified HILIC/AEX/MS/MS）を開発した．本セッションでは，unified HILIC/AEX 法のクロマトグラフィー分離の原理，三連四重質量分析計（triple-quadrupole mass spectrometer, QqQMS）の高感度分析モードの原理について概説し，ノウハウを含めた実践プロトコルを解説する．

Essential metabolic pathways to maintain biological activities include glycolysis, pentose phosphate pathway, tricarboxylic acid cycle, amino acid, and nucleic acid metabolism. Almost all intermediates of these metabolic pathways are polar and ionic compounds such as amino acids, nucleic acid constituents, organic acids, sugar phosphates, coenzyme, etc. Therefore, a profiling for these hydrophilic metabolites provides valuable insight towards understanding metabolic regulation. However, since these hydrophilic metabolites have a wide variety of physicochemical properties, it is difficult to comprehensively measure them with a single analytical run. In the present study, we have developed a highly sensitive and practical analytical method that provides wide metabolite coverage using unified hydrophilic interaction/anion exchange liquid chromatography tandem mass spectrometry (unified HILIC/AEX/MS/MS) with a novel polymer-based amino column.

Hydrophilic metabolites, LC/MS/MS, Unified HILIC/AEX

講演番号：3JS-04
講演日時、会場：3 月 20 日 16:15～ ミーティングルーム J

脂質メディエーター類の質量分析プロトコル

Tips on lipid mediator analysis using LC-MS

○北 芳博（東大医）
○Yoshihiro Kita (Univ. Tokyo)

脂質メディエーター類の多くは生体内で極微量かつ一過的に生じる脂質代謝物である。そのため、脂質メディエーター類のメタボローム・リピドーム分析は、試料の採取、取り扱い、前処理、測定、定量解析のすべての点において、経験と技術が重要である。本発表では、発表者の研究グループでこれまでに構築してきた脂質メディエーター類解析のプロトコールを開発の経緯やコンセプトとともに紹介し、実際に遭遇するであろうトラブルやそれに対する対処、現状における課題と今後の展望を含め、情報を共有する場としたい。

Most lipid mediators are lipid metabolites that occur transiently and in extremely small amounts in vivo. Therefore, 'omics' analysis of lipid mediators requires experience and techniques in all aspects of sample collection, handling, pretreatment, measurement, and quantitative analysis. In this presentation, I would like to introduce detailed protocols for lipid mediator analysis that have been developed by the presenter's research group, along with the history and concept of its development, and to share information on the problems that may be encountered and how to deal with them, as well as current issues and future prospects.

Lipid mediator, Eicosanoid, Mass spectrometry

講演番号：3JS-05
講演日時、会場：3 月 20 日 16:40～ ミーティングルーム J

メタボロミクスのデータ解析のプロトコル
Metabolomics Data Analysis Protocol
○津川 裕司[1,2] ([1]理研 CSRS、[2]理研 IMS)
○Hiroshi Tsugawa[1,2] ([1]RIKEN CSRS, [2]RIKEN IMS)

メタボロミクスにおけるデータ解析は大きく分けて 2 つの行程に分けられる。１つは、計測データから代謝物情報を抽出してデータ行列（各試料中の代謝物存在量をテーブル化したもの）を作成する行程であり、もう１つは、それら代謝物情報を用いて生物学的な解釈を行うデータサイエンス行程である。近年、アカデミアの拠点化やメタボローム受託サービスも浸透してきており、前者の行程は自分自身で行わない状況も増えてきているように思えるが、自前で装置を購入した際には必須の行程である。中でも、ガスクロマトグラフィー質量分析（GC-MS）を用いた親水性メタボロミクス、液体クロマトグラフィータンデム質量分析（LC-MS/MS）によるノンターゲットリピドミクス、そして三連四重極型質量分析（QqQ/MS）を用いたターゲット解析は前処理・計測方法・データ解析の全行程で標準化が推進されており、比較的簡便に系を導入できるようになってきた。一方、前段が簡便に遂行可能な状況にある昨今、後者のデータ解釈行程の重要性が更に増してきている。統計処理、多変量解析、未知化合物の構造推定、他の階層データとの統合解析、パスウェイ解析など、実験設計や試料背景に応じて様々な方法が考えられる。さらに、このようにして産出されたメタボロームデータを用いて投稿するにあたり、質量分析の生データや代謝物テーブルを公共レポジトリに公開し、代謝物テーブルにおける表記方法もある程度標準化が進められており、国際標準に沿った形での公開が望まれる。本発表では、上記すべてのオーバービューを行い、これからメタボロミクスを始めようとする方のデータ解析ガイドラインを説明する予定である。

metabolomics, data analysis, protocol

講演番号：3JS-06
講演日時、会場：3 月 20 日 17:05～ ミーティングルーム J

メタボロミクスの将来計画
Future plan of metabolomics

○松田 史生 (阪大情報)
○Fumio Matsuda (Osaka Univ.)

メタボロミクスは農学をはじめとする様々な領域において必須のツールとなっている。特に食品の品質評価、農薬の作用機差解明、有用物質生産微生物の代謝律速部位の同定、健康を守るためのコホート研究などで活躍している。本講演ではメタボロミクスをさらに発展、活用させるための展望について議論したい。
天然物有機化学としてのメタボロミクス：生体中代謝成分の機器分析を行うメタボロミクスの発展に、天然物有機化学を背景とする研究者が大きく貢献してきた。膨大な数の構造未知成分が残されており、鍵となる未知成分の構造を確実に決定していくことが、新規代謝物および新たな代謝機能の解明につながる。
表現型定量技術としてのメタボロミクス：メタボロミクスの強みは、生体中の代謝成分含量を表現型として数値化できる点にある。この強みをさらに生かし、有用な知見へとつなげるには、代謝成分含量の測定データを大規模に集積する必要がある。その実現に向けた技術開発は、基礎と応用を担う研究者間の連携が必要とされる。そこで、最近われわれが実施したメタボロミクスデータの統合に向けた代謝物相対定量値の実験室間比較[1]についてその成果を紹介する。
Metabolomics is an essential tool in various research fields including bioscicence. This talk address a future plan for more improvement and intensive application of metabolomics technologies.
Metabolomics as natural product chemistry: Metabolomics data are still containing large amount of unknown metabolites. Structural identification of key metabolites is promising to find novel metabolites and their biological functions
Metabolomics as a phenotyping tool: Integration of metabolome data has been desired to investigate a relationship between various genetic/environmental factors and metabolic phenotypes. I would like to introduce the results of interlaboratory comparison of relative quantitative values of metabolites[1].

1. Izumi et al. Metabolites. 2019, 9(11): 257.

Metabolomics, Natural product chemistry, Phenotype

講演番号：4AS-01
講演日時、会場：3 月 21 日 15:00～ ミーティングルーム A

複雑骨格を構築する生合成マシナリーの機能予知

Functional forecast of biosynthetic machinery for constructing complex skeletons

○葛山 智久 [1,2] ([1] 東大院・農生科、[2] 東大・微生物連携機構)
○Tomohisa Kuzuyama[1,2] ([1]GSALS, UTokyo, [2]CRIIM, UTokyo)

一次代謝からの連続的な延長によって生合成される二次代謝産物は、生物、特に微生物と高等植物が進化の過程で長い年月をかけて作り上げてきた多様な構造をもつ生体機能分子である。人類は、これらの二次代謝産物を医薬品などのリード化合物として利用してきた。一方で、そのような多様な二次代謝産物(もっぱら天然物と呼ぶことの方が多い)がどのように生合成されるのかという疑問は、多くの研究者の知的好奇心を刺激してきた。昨今では、様々な天然物の生合成遺伝子クラスター(設計情報)が同定され、生合成酵素(生合成マシナリー)の詳細な機能解析や立体構造解析、さらには計算化学による遷移状態を含めた反応過程の解析も可能となっている。また、天然物の生合成遺伝子の再構築や、酵素の立体構造に基づく論理的な改変によって、「非天然型の天然物」を創出する研究(生合成リデザイン)も多く見受けられるようになってきた。本発表では、最近の天然物研究の一例として、放線菌が生産するジテルペン化合物、cyclooctatin の生合成研究を紹介する。また、引き続き、5 名の講演者で、「天然物研究の未来」に関するパネルディスカッションを行う。

In this presentation, I will talk about biosynthesis of cyclooctatin, a diterpene having a unique tricyclic C_{20} diterpene skeleton characterized by a 5-8-5 fused ring system. This diterpene is a potent inhibitor of lysophospholipase, which was isolated from the culture broth of *Streptomyces melanosporofaciens* MI614-43F2. We have demonstrated that diterpene cyclase CotB2 catalyzes the cyclization of geranylgeranyl diphosphate to produce cyclooctat-9-en-7-ol, a tricyclic diterpene alcohol intermediate in cyclooctatin biosynthesis. We proposed a mechanism of the one-pot cyclization reaction, which involves an unusual carbon−carbon bond rearrangement in catalysis. Structural basis of the unusual cyclization reaction will also be presented. After this presentation, the five speakers will hold a panel discussion about “the future of natural product research”.

cyclase, natural products, terpene

講演番号：4AS-02
講演日時、会場：3 月 21 日 15:20～ ミーティングルーム A

分子シミュレーションによる酵素触媒機構の解析
Molecular simulation analyses of catalytic mechanisms of enzymes

○寺田 透[1,2]、森脇 由隆[1,2]、山田 真行[3]、清水 謙多郎[1,2,3]([1]東大・院農・応生工、[2]東大・微生物連携機構、[3]東大・院情報理工・コンピュータ科学)
○ Tohru Terada[1,2], Yoshitaka Moriwaki[1,2], Masayuki Yamada[3], Kentaro Shimizu[1,2,3] ([1]Dept. Biotechnol., Univ. Tokyo, [2]CRIIM, Univ. Tokyo, [3]Dept. Comput. Sci., Univ. Tokyo)

分子シミュレーションは、酵素と基質の立体構造モデルを用いて構造と機能の関係を研究する強力な手法である。これには、立体構造予測やドッキングシミュレーション、分子動力学シミュレーション、量子化学計算が含まれる。我々は、これらの手法を用いて、酵素の触媒機構の研究を行っている。本シンポジウムでは、まず、催涙因子合成酵素（LFS）の触媒機構に関する研究成果を紹介する。LFS はタマネギに存在する酵素で、(*E*)-1-propene-1-sulfenic acid（1-PSA）を *syn*-propanethial *S*-oxide（PTSO）に変換する反応を触媒する。1-PSA は非常に不安定なため、実験的な手法を用いた触媒機構の研究は困難であった。我々は、LFS と 1-PSA の複合体のモデリングを行い、このモデルに対して分子動力学シミュレーションを行った。さらに、量子化学計算を行い、反応機構を解析した。次に、パラヒドロキシ安息香酸水酸化酵素（PHBH）に関する研究成果を紹介する。PHBH はパラヒドロキシ安息香酸（*p*-OHB）を、3,4-ジヒドロキシ安息香酸（3,4-DOHB）に変換する。我々は、3,4-DOHB を効率的に没食子酸に変換する変異体を設計した。我々は、分子動力学シミュレーションと量子化学計算の結果に基づいて、変異によって反応特異性が変わるメカニズムを明らかにした。

Molecular simulations are powerful methods to study structure-function relationships of enzymes using structural models of the enzymes and their substrates. They include tertiary structure prediction, docking simulation, molecular dynamics (MD) simulation, and quantum mechanical (QM) calculation. We have studied catalytic mechanisms of enzymes using these techniques. In this symposium, we will first present the catalytic mechanism of lachrymatory factor synthase (LFS). LFS exists in onion and converts (*E*)-1-propene-1-sulfenic acid (1-PSA) to *syn*-propanethial *S*-oxide (PTSO). Because 1-PSA is very unstable, it was difficult to study the catalytic mechanism with experimental methods. We modeled a complex structure between LFS and 1-PSA, performed MD simulations for the model, and analyzed the reaction mechanism by QM calculations. Second, we will present a study on *p*-hydroxybenzoate hydroxylase (PHBH). PHBH converts *p*-hydroxybenzoate (*p*-OHB) to 3,4-dihydroxybenzoate (3,4-DOHB). We designed a mutant that efficiently converts 3,4-DOHB to gallic acid. We clarified the mechanism of the alteration of the reaction specificity by the mutation based on the results of MD simulations for the enzyme-substrate complex models and QM calculations.

molecular simulation, quantum mechanical calculation, catalytic mechanism

講演番号：4AS-03
講演日時、会場：3 月 21 日 15:40～ ミーティングルーム A

新規ペプチド環化酵素 PBP-type TE の機能解析

Funactional analysis of PBP-type TE, a novel peptide cyclase

○脇本 敏幸（北大薬）
○Toshiyuki Wakimoto (Hokkaido Univ.)

天然由来中分子には大環状骨格を有する化合物が数多く存在する。鎖状構造に比べて大環状構造には活性配座の固定化、代謝酵素に対する安定性、膜透過性の向上など様々な優位性が期待される。しかし中分子の環化反応は有機合成反応の中でも難しい反応の一つである。反応点となる両末端を近づけることが難しい上に、反応点が分子内に複数存在する場合は、目的の位置選択性を得るために保護, 脱保護工程が不可欠になる。さらに望む分子内反応と、望まない分子間反応が反応溶液中で競合するために、高希釈条件が必須となる。特にこの点は大スケールの環化工程において欠点となる。一方で、天然物の大環状骨格は生合成酵素によって極めて効率的に生合成されている。我々はこれまで、放線菌の生産する非リボソーム型環状ペプチド（NRPS）の生合成に関わる全く新しいペプチド環化酵素 SurE を発見し、新規ペプチド環化酵素ファミリーPBP-type TE の存在を提唱してきた。PBP-type TE は NRPS に作用する独立型のチオエステラーゼであり、head-to-tail 型の環状ペプチドの合成に関与し、幅広い基質特異性を示すため、大環状中分子の効率的合成を実現する新たな生体触媒として期待される。

There are many naturally occurring molecules with macrocyclic skeletons. Compared to the linear structure, the macrocyclic structure is expected to offer various advantages such as the rigid conformation suitable for the target binding, stability against metabolic enzymes, and improved membrane permeability. However, cyclization of medium-sized molecules is one of the most difficult reactions in organic synthesis. In addition to the difficulty in bringing the two ends of the reaction point close together, protection and deprotection steps are essential to achieve the desired regioselectivity. Moreover, high dilution conditions are required to avoid the undesired intermolecular reaction, which is especially a drawback in large scale cyclization processes. On the other hand, the macrocyclic skeleton of natural products is biosynthesized efficiently by macrocyclases. We have recently discovered a novel peptide macrocyclase, SurE, which belongs to PBP-type TEs, a novel family of peptide cyclizing enzymes. They are stand-alone thioesterases that act on NRPS, are involved in the synthesis of head-to-tail cyclic peptides, and exhibit a wide range of substrate specificity, making them promising new biocatalysts for the efficient synthesis of macrocyclic molecules.

Nonribosomal peptide synthetase, Macrocyclase, Cyclic peptides

講演番号：4AS-04
講演日時、会場：3 月 21 日 16:00～ ミーティングルーム A

シトクロム P450 を誤作動させる分子を用いる高難度酸化反応

Extremely Difficult Oxidation Reactions Catalyzed by Cytochrome P450 Exploiting Substrate Misrecognition Induced by Decoy Molecules

○荘司 長三[1,2]、愛場 雄一郎[1]、有安 真也[1] ([1]名大院理、[2]JST CREST)
○Osami Shoji[1,2], Yuichiro Aiba[1], Shinya Ariyasu[1] ([1]Nagoya Univ., [2]JST CREST)

シトクロム P450BM3(P450BM3)は，巨大菌由来の長鎖脂肪酸水酸化酵素であり，長鎖脂肪酸のアルキル鎖末端部分を水酸化する．酵素活性が非常に高く，バイオ触媒としての利用が早くから期待されてきた．P450BM3 は，ヘムを活性中心として酸素分子を還元的に活性化することで，強力な酸化活性種を生成する．酸素分子を還元的に活性化する酸化活性種生成には，還元蛋白質を介する NADPH からの電子供給が必要であり，長鎖脂肪酸の取り込みが反応を開始するスイッチになっている．P450BM3 は，長鎖脂肪酸が適切な位置に取り込まれた場合にのみ電子が供給されて酸化活性種を生成するように設計されており，長鎖脂肪酸と構造が大きく異なる有機分子では，P450BM3 のスイッチは「ON」の状態とはならない仕掛けで反応が制御されているため，エタンやベンゼンなどを水酸化しようとしても反応は全く進行しない．我々は，「擬似基質」（デコイ分子）を P450BM3 に取り込ませることで酸化活性種を強制的に生成させる反応システムを開発した．デコイ分子の存在下では，エタンやプロパンなどのガス状アルカンやベンゼンやトルエンなどの芳香族化合物を水酸化できるようになる．デコイ分子を用いる触媒反応は，デコイ分子の構造によりその酸化活性が大きく変化するため，新規デコイ分子を設計することで，反応システムの更なる高活性化が可能である．

Cytochrome P450BM3 (P450BM3) is one of the most promising P450s for construction of biocatalysts because of its high monooxygenase activity. Because the substrate binding is crucial for the generation of active species of P450BM3 (Compound I), substrates whose structures are largely different from that of its native substrates (long-alkyl-chain fatty acids) cannot be hydroxylated by P450BM3. However, we found that P450BM3 starts to catalyze hydroxylation of nonnative substrates in the presence of dummy substrates having structural similarity to fatty acids (decoy molecules). Decoy molecules initiate the activation of molecular oxygen in the same manner as with long-alkyl-chain fatty acids and induce the generation of compound I, but the compound I hydroxylates gaseous alkanes and benzene. Recently, we have succeeded in developing a different type of decoy molecules such as *N*-acyl amino acids and dipeptide derivatives utilizing various carboxylic acids and amino acids as a building block and succeeded in enhancing the catalytic activity for gaseous alkanes. Ethane hydroxylation was drastically enhanced in the presence of *N*-enanthoyl-*L*-pipecolyl-*L*-phenylalanine. More recently, we have developed decoy molecules that can facilitate crystallization of P450BM3 resulting in high resolution crystalstructure analysis of various flavors of the P450BM3 heme domain.

Cytochrome P450, Decoy molecule, Substrate misrecognition

講演番号：4AS-05
講演日時、会場：3 月 21 日 16:20～ ミーティングルーム A

生合成を拡張した化学ー酵素ハイブリッドプロセスの開発を目指して

Toward the development of a biogenetically inspired chemoenzymatic process

○大栗 博毅（東大院理）
○Hiroki Oguri (The University of Tokyo)

植物や菌類の二次代謝経路では、シンプルな構築ブロックがモジュラー式に連結された後、主に分子内環化や酸化反応を経て複雑な多環式骨格群が生合成される。演者らは生合成を摸倣しつつ、天然物やそのアナログ群の構造を多様化する迅速合成プロセスを開発している。本講演では、テトラヒドロイソキノリン(THIQ)アルカロイドの化学ー酵素ハイブリッド迅速合成を紹介する。

サフラマイシンやエクテナサイジンに代表される抗腫瘍性 THIQ アルカロイド群は、複雑な五環性母骨格を共有する。本研究では酵素 SfmC を活用し、THIQ アルカロイド群を系統的に構築する化学ー酵素ハイブリッドプロセスを開発した。酵素反応の基質として、チロシン誘導体、長鎖アルキル鎖を有するペプチジルアルデヒドを設計・合成した。酵素 SfmC による五環性骨格の構築とアミノニトリルの導入、二級アミンに対する還元的アミノ化を実施した。酵素変換で得られる中間体を単離せずに連続的に官能基変換を施すアプローチにより、シンプルな合成基質からわずか一日で五環性骨格を迅速合成した。得られた五環性骨格のエステル部位を加水分解して長鎖脂肪酸側鎖を除去した後、キノンへ酸化し、天然物ジョルナマイシン A の 4 ポットでの合成に成功した。更に、酵素変換後に側鎖の除去が可能な官能基を組み込んだ基質群を設計し、サフラマイシン A やその類縁体の合成を実現した。このように酵素変換と化学合成を融合するアプローチにより、THIQ アルカロイド群を系統的に迅速合成する化学−酵素ハイブリッドプロセスを開発することができた。

In this symposium, we will mainly introduce chemo-enzymatic synthesis of tetrahydroisoquinoline (THIQ) alkaloids. By merging synthetic biology with synthetic chemistry, this hybrid approach enables both expeditious assembly of the complex scaffold and flexible structural diversification of the biologically intriguing alkaloids. The common pentacyclic scaffold of the anti-tumor THIQ alkaloids is biosynthesized by non-ribosomal peptide synthetases (NRPSs) involving unique enzymatic Pictet-Spengler cyclizations. Recently, we achieved concise and divergent chemo-enzymatic total syntheses of the THIQ alkaloids by streamlining precise chemical synthesis with *in vitro* engineered biosynthesis. A recombinant enzyme SfmC responsible for the biosynthesis of saframycin A was adapted for the conversions of designer substrates. This approach allowed rapid access to the elaborated pentacyclic skeleton *in a single day* starting from two simple synthetic substrates. Further functional group manipulations allowed operationally simple and expeditious syntheses of jorunnamycin A, saframycin A, and *N*-Fmoc saframycin Y3.

biosynthesis, chemoenzymatic synthesis, tetrahydroisoquinoline alkaloids

講演番号：4BS-01
講演日時、会場：3 月 21 日 15:05～ ミーティングルーム B

超好熱性アーキアにおけるリジン・アルギニンの生合成
Biosynthesis of lysine and arginine in hyperthermophilic archaea

○西山 真[1,2] ([1] 東大・生物工学セ、[2] 東大・微生物連携機構)
○Makoto Nishiyama[1,2] ([1]BRC, UTokyo, [2]CRIIM, UTokyo)

我々は高度好熱性細菌 *Thermus thermophilus* がこれまで知られていない経路および機構でリジンを生合成することを見出してきた。通常の細菌では、リジンはアスパラギン酸を出発物質としてジアミノピメリン酸を経由して生合成されるが、*T. thermophilus* では 2-オキソグルタル酸(2OG)を出発物質として、2-アミノアジピン酸(AAA)を経由して生合成される。同生合成は、2OG から AAA を経由するという点では、酵母などの生合成と同様であるが、その最大の特徴は AAA からリジンまでの変換に新規キャリアタンパク質(アミノ基キャリアタンパク質；AmCP)を利用する点にある。また、その部分の反応は酵母などのものとは異なっており、アルギニン生合成のものと類似している。こうした AmCP を介したリジン生合成は一部の細菌に見出されるが、興味深いことに、多くの好熱性アーキアではリジンだけでなく、アルギニン生合成もまた AmCP を利用する。本シンポジウムでは、アーキアのリジン、アルギニン生合成や調節機構について紹介し、その進化について考察したい。

We have found that a hyperthermophilic bacterium, *Thermus thermophilus*, biosynthesizes lysine by unprecedented pathways and mechanisms. In most bacteria, lysine is biosynthesized from aspartic acid as a starting material with diaminopimelic acid as an intermediate, whereas in *T. thermophilus* 2-oxoglutaric acid (2OG) is used as a starting material with 2-aminoadipic acid (AAA) as an intermediate. The biosynthesis is similar to that of yeast in that 2OG is converted to lysine with AAA as an intermediate; however, its unique feature is that it uses a novel carrier protein (amino-group carrier protein; AmCP) in the second half of the pathway, conversion of AAA to lysine. In addition, a series of reactions involved in the AAA-to-lysine conversion are different from those of yeast but similar to those of arginine biosynthesis. Similar AmCP-mediated lysine biosynthesis is found in some bacteria; however, interestingly, in many hyperthermophilic archaea, AmCP is used for biosynthesis of both lysine and arginine biosynthesis. In this symposium, I would like to introduce the biosynthesis of the archaeal lysine and arginine and their regulatory mechanism and discuss their evolution.

archaea, lysine and arginine biosynthesis, carrier protein

講演番号：4BS-02
講演日時、会場：3 月 21 日 15:28～ ミーティングルーム B

アミノ酸の新たな利用の可能性～有用ピラジン化合物の生合成と代謝工学～
Microbial pyrazine synthesis from amino acids
○桝尾 俊介[1,2]、高谷 直樹[1,2] ([1]筑波大学生命環境系、[2]筑波大学微生物サステイナビリティ研究センター)
○Shunsuke Masuo[1,2], Naoki Takaya[1,2] ([1]University of Tsukuba, [2]Microbiology Research Center for Sustainability)

微生物は非常に多様なアミノ酸の代謝酵素・経路を有しており、アミノ酸から抗生物質などの様々な有用物質を生産する。合成生物学研究の発展により、様々な代謝酵素を組合わせた人工生合成経路を特定の生物細胞内に構築することで、天然あるいは非天然アミノ酸に由来する様々な有用化合物を生産できるようになってきた。生産可能なアミノ酸由来の有用化合物ライブラリを拡充するには、より多様な生合成経路を構築する必要があるが、これには微生物の多様なアミノ酸代謝を理解することが必要不可欠である。また、世界をリードする我が国のアミノ酸発酵技術を活用すれば、これら有用化合物の大量生産系の構築が可能となる。

本講演では、芳香族アミノ酸類縁体の発酵生産系を構築する過程で発見した、*Pseudomonas* 属細菌のピラジン生合成機構について発表する。演者らはこれまでに、*P. fluorescens* SBW25 株の *papABC* が 4-アミノフェニルアラニン(4APhe) 生合成遺伝子であることを示し、これを用いて 4APhe とその類縁体の発酵生産系を構築してきた。*papABC* の近傍には 3 つの機能未知遺伝子 (*papDEF*) が存在しており、我々はその機能解析を進めた。その結果、これらが 4-アミノベンジル基を側鎖に有するピラジン化合物の生合成に関わることを明らかとした。PapABC により生合成された 4APhe は、新規 α-oxoamine synthase の PapD によりアミノケトンへと変換され、２分子のアミノケトンの自然重合により生じた還元型のジヒドロピラジンが PapF により酸化されピラジンが形成される新たな生合成メカニズムを明らかとした。本講演では、アミノ酸原料からの種々のピラジン類縁体の生産に向けた取り組みについても紹介したい。

Microorganisms metabolize a wide variety of amino acids, and produce various bioactive compounds that include antibiotics and anticancer drugs. Understanding diverse amino acid metabolisms is indispensable for expanding synthetic biology tools for production of amino acid-derivatives.

Pyrazines are biologically active pheromones and odors distributed among biological systems while their biosynthesis mechanism are fairly understood. The function of bacterial pap gene cluster revealed unique pathway for 2,5-dimethyl-3,6-bis(4-aminobenzyl)-pyrazine (DMBAP) synthesis that novel family of α-oxoamine synthase initially converts an amino acid to aminoketone, which couples to be a dihydropyrazine and forms the pyrazine DMBAP by novel dihydropyrazine oxidase. This finding establishes the novel enzymic framework of pyrazine biosynthesis.

pyrazine, biosynthesis, amino acids

講演番号：4BS-03
講演日時、会場：3 月 21 日 15:47～ ミーティングルーム B

アルギニンによる酵母のプロリン資化抑制機構

Inhibitory effect of arginine on proline utilization in *Saccharomyces cerevisiae*

○西村 明、高木 博史（奈良先端大・バイオ）
○Akira Nishimura, Hiroshi Takagi (Division of biological science, NAIST)

アミノ酸の一種であるプロリンはタンパク質の構成成分としてだけでなく、遊離状態のものが多彩な機能を有しているため、様々な分野で注目されている。特に食品・発酵分野において、プロリンは甘味（低濃度の場合）や苦み（高濃度の場合）を呈し、味に直接的な影響を与えるため、興味が持たれている。プロリンはワインの原料であるブドウ果汁に最も多く含まれているアミノ酸であるが、発酵中の酵母はプロリンをほとんど利用することができず、発酵後も多量に残存することが知られている。残存したプロリンは苦味の増加や酸味の減少を引き起こし、最終製品であるワインの酒質を低下させる。さらに、酵母が豊富に存在するプロリンを窒素源として利用できないため、発酵中に窒素源の枯渇がしばしば起こり、人工窒素源（アンモニウム塩）の添加が必要となる。このため、プロリンは 30 年以上前から「無駄で厄介な窒素源」として認識されている。

最近、我々は発酵環境下においてプロリンを効率良く資化できる酵母の創製を目的に、プロリン資化抑制に関わる因子のスクリーニングを行った。その結果、ブドウ中に 2 番目に多い窒素源であるアルギニンが阻害因子であることを見出した。さらに、アルギニンはユビキチンリガーゼ Rsp5 とそのアダプタータンパク質である Art3 依存的にプロリントランスポーターPut4 のエンドサイトーシスを誘導し、プロリンの取込みを阻害することが判明した。次に、アルギニンによるプロリン資化抑制機構を解明するために、アルギニン存在下でもプロリン資化能が低下しない変異株を取得した。その結果、アルギニントランスポーターをコードする *CAN1* 遺伝子の変異によって、アルギニンのプロリン資化抑制効果が消失することを見出した。驚いたことに、この Can1 変異体のアルギニントランスポーター活性は野生型株と同等であり、Can1 にはアルギニントランスポーター以外の機能が存在することが示唆された。今後、実験室酵母で得られた知見をもとにワイン酵母を育種することで、プロリン含量の低いワインの製造に繋がり、酒質の差別化が可能であると考えている。

Proline is a predominant amino acid in grape must, but it is poorly utilized by the yeast *Saccharomyces cerevisiae* in wine-making processes. Our present results showed that arginine is an inhibitory factor of proline utilization and induces endocytosis of the proline transporters Put4, leading to the impairment of proline uptake. Our study could hold promise for the development of wine yeast strains that can efficiently assimilate the abundant proline under fermentation conditions.

Wine fermentation, Proline utilization, Arginine

講演番号：4BS-04
講演日時、会場：3 月 21 日 16:06～ ミーティングルーム B

酵母のメチオニン代謝産物によ寿命制御機構

Methionine metabolites modulate lifespan in yeast

○水沼 正樹（広島大・院統合生命）
○Masaki Mizunuma (Hiroshima Univ.)

アミノ酸は単なる生体分子としてのみならず、発生、代謝、ストレス耐性、老化・寿命など多彩な生理機能を有することが分かってきた。また、近年の酵母・線虫・ショウジョウバエなどのモデル生物を用いた研究から、食餌制限による寿命延長の基本的な仕組みが明らかになり、生物種を問わず共通点が多いことがわかった。食餌制限の中でも、アミノ酸の役割も明らかにされ、特に必須アミノ酸であるメチオニン制限は寿命が延長することが分かった。我々は、新規寿命延長メカニズムを明らかにするため、酵母を使って野生株よりも顕著に寿命が延長した変異株の取得に成功した(変異を *SSG1* と命名)。*SSG1* 変異株の解析から、寿命延長にアミノ酸の一種であるメチオニン代謝産物・*S*-アデノシルメチオニン(SAM)が関与することを世界に先駆けて見出した。具体的には、SAM の合成を促進させると、AMP 依存性キナーゼ AMPK が活性化し寿命延長する、これまでにない寿命延長メカニズムを提唱した。興味深いことに、SAM の拮抗阻害物質である *S*-アデノシルホモシステイン(SAH)を添加しただけでも、先と同様のメカニズムにより寿命延長することが分かった。Ssg1 タンパク質は、薬剤排出トランスポーターMATE ファミリーと相同性を有したことから、*SSG1* は SAM 濃度調節に関わることが予想された。本シンポジウムでは、Ssg1 タンパク質の機能を通してわかってきた寿命制御における SAM/SAH の役割やその生理的意義などついて議論したい。

Dietary restriction (DR) such as methionine (Met) restriction extends lifespan in diverse model organisms. *S*-adenosyl-L-methionine (SAM) is a central coenzyme in the metabolism that occurs in the majority of biological methylation reactions. SAM-dependent transmethylation is central to the regulation of numerous biological processes including metabolism, signal transduction, and gene expression. In transmethylation reactions, SAM is converted to SAH, an inhibitor of methyltransferases. However, little is known about the molecular mechanism underlying the key metabolites responsible for delaying the aging process. We presented evidence that stimulating SAM synthesis turned on a metabolic switch that led to enhanced stress resistance and longevity of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Stimulating SAM synthesis activated the universal energy-sensing regulator Snf1, which is the *S. cerevisiae* ortholog of AMP-activated protein kinase (AMPK), resulting in lifespan extension. Unexpectedly, supplementing the medium with SAH contributed to an extended lifespan with a higher accumulation of SAM than of SAH. We will discuss the implications of molecular links between a methionine metabolite and lifespan.

Methionine, Yeast, Lifespan

講演番号：4BS-05
講演日時、会場：3 月 21 日 16:25～ ミーティングルーム B

清酒酵母の機能性成分高蓄積機構と醸造特性との関係性

Relationship between the mechanism of high functional component accumulation and brewing characteristics in sake yeast

○金井 宗良（酒総研）
○Muneyoshi KANAI (NRIB)

【日本語】

様々な微生物の中でも酵母、特に清酒酵母に高含有している機能性成分である *S*-アデノシルメチオニン（SAM）と葉酸に着目し、清酒酵母における SAM 及び葉酸の高蓄積機構や生理学的意義を解明することで、清酒酵母の様々な特性の全容を分子レベルで把握することを目的とし研究を行っている。まず、酵母細胞内での SAM 高蓄積機構の理解を目的に、SAM 高蓄積に寄与する新規遺伝子としてアデノシンキナーゼをコードする *ADO1* 遺伝子を同定し、*ADO1* 遺伝子破壊株が示すコルディセピン耐性を指標に、遺伝子組換え体にあたらない実用可能な SAM 高蓄積酵母の取得方法を開発し、実用清酒酵母の育種に成功した。次に、清酒酵母の SAM 及び葉酸高蓄積能に寄与する遺伝子として *ERC1* 遺伝子（多剤・毒性化合物排出活性を持つ膜タンパク質）を同定し、清酒酵母が持つ SAM 及びテトラヒドロ葉酸高蓄積能に清酒酵母型 Erc1 の機能が深く関与していることを見出した。さらに、清酒製造において、清酒酵母型 Erc1 の機能がアルコール発酵を正に制御していること、また清酒酵母のアルコール高発酵性と細胞内 SAM の蓄積との間に深い関係性があることを明らかとした。

今後、清酒酵母に特に高蓄積する SAM の生理的機能の全容を解明することで、高品質の酒質を可能とする優良酵母の育種技術の開発や、酒粕のような醸造副産物の高付加価値化・高機能化等への応用展開が期待される。

【English】

S-adenosylmethionine (SAM) is a key regulatory compound in various biological reactions and functions as a major donor of methyl groups. SAM is highly accumulated in vacuoles in sake yeast compared to other yeast strains, bacteria, molds, or other microorganisms. To isolate a SAM-accumulating yeast strain, we screened methionine resistant strains using the yeast deletion library of budding yeast and identified *ADO1* encoding adenosine kinase as one of the factors participating in high SAM accumulation. Next, to elucidate the mechanism underlying SAM accumulation in sake yeast strains compared with that in laboratory yeast strains, we performed quantitative trait locus (QTL) analysis and identified *ERC1* gene, encoding a member of the multi-drug and toxin extrusion family having antiporter activity. Expression of the sake yeast *ERC1* haplotype resulted in intracellular SAM accumulation.

sake yeast, *S*-adenosylmethionine, brewing characteristics

講演番号：4BS-06
講演日時、会場：3 月 21 日 16:44～ ミーティングルーム B

アミノ酸高含有酵母による清酒・酒粕の高付加価値化

High value-added sake and sake cake brewed with amino acid-accumulating yeast strains

○小高 敦史（月桂冠株式会社）
○Atsushi KOTAKA (Gekkeikan Sake Co., Ltd.)

発酵・醸造食品の風味の差別化や健康イメージの向上などを目的として、我々は種々のアミノ酸アナログを用い、細胞内の各アミノ酸含量を高めた清酒酵母を育種してきた。本シンポジウムでは、アミノ酸高含有株の解析、ならびにこれらの株を用いた清酒・酒粕の高付加価値化について紹介する。
１）プロリン高含有株：グルタミン酸からのプロリン生合成の鍵酵素である γ-グルタミルキナーゼの遺伝子（*PRO1*）にアミノ酸置換を伴う新規な変異を見出した。また、既知のアミノ酸置換と比較して、プロリンによるフィードバック阻害感受性が顕著に低下することを明らかにした。本株を用いて清酒醸造を行ったところ、親株と比べて清酒中のプロリン含量が増加し、コハク酸含量が減少した。プロリンは甘味、コハク酸は旨味のある酸味であることが知られていることから、本菌株は淡麗辛口清酒の呈味性改良への応用が考えられる。一方、酒粕中のプロリンは親株に比べて約 3 倍に増加したことから、機能性酒粕、天然素材化粧品への展開が可能になり、酒粕の高付加価値化が期待できる。
２）バリン高含有株：ピルビン酸からのバリン生合成の初発反応を触媒するアセトヒドロキシ酸合成酵素の遺伝子（*ILV6*）にアミノ酸置換を伴う新規な変異を見出した。本菌を用いて清酒醸造を行ったところ、親株と比べて清酒中のイソブタノール、酢酸イソブチルの含量が増加した。酢酸イソブチルは、代表的な吟醸香とは異なる爽やかな香りであるため、香味性の差別化が可能な清酒への応用が考えられる。
３）イソロイシン高含有株：ピルビン酸からのイソロイシン生合成の初発反応を触媒するスレオニンデアミナーゼの遺伝子（*ILV1*）にアミノ酸置換を伴う新規な変異を見出した。本菌を用いて清酒醸造を行ったところ、親株と比べて清酒中の活性アミルアルコール、酢酸活性アミルの含量が増加した。現在、従来の清酒とは異なる香味性を有する清酒への応用を検討中である。
本研究は、農研機構生研支援センター「イノベーション創出強化研究推進事業」の支援を受けて実施した。

In order to differentiate the flavor of fermented foods and improve their health image, we have bred sake yeast strains that highly accumulate various amino acids in the cells derived from the toxic amino acid analog-resistant mutants. In this symposium, we will introduce the functions of sake yeast strains with higher amino acid contents. Also, the high value-added of sake and sake cakes brewed with these strains will be explained.

Sake, Sake cake, Amino acid

講演番号：4BS-07
講演日時、会場：3 月 21 日 17:03～ ミーティングルーム B

「アミノ酸機能工学」による酵母の高機能開発とその産業応用

Development of highly functional yeasts and their industrial application by “functional amino acids engineering“

○高木 博史（奈良先端大バイオ）
○Hiroshi Takagi (Nara Inst. Sci. Tech.)

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* のアミノ酸代謝とその制御機構は生育環境や代謝様式で異なり、それらの仕組みを解明し、生命現象を理解することが重要である。また、酵母は発酵産業に広く利用されているが、アミノ酸の生産に活用した例は少ない。酵母を用いて製造される発酵・醸造食品に含まれるアミノ酸含量を高めることができれば、発酵・醸造食品の生産性改善、高付加価値化が期待できる。

本講演では、酵母に見出したアミノ酸の代謝制御機構や生理機能に基づき、アミノ酸代謝を人為的に改変し、酵母の高機能開発および産業酵母の育種に応用した例（アミノ酸機能工学）を紹介する。

１）ロイシン（Leu）代謝を介した香気成分の生成能強化と泡盛醸造への応用：清酒やパンの主要な香気成分（吟醸香、バナナ様）として知られる酢酸イソアミルは、Leu の合成経路の中間体から生成される。我々は沖縄の蒸留酒「泡盛」の高付加価値化を目的に、泡盛酵母やハイビスカス花から分離した酵母の Leu 高生産変異株から、親株に比べて酢酸イソアミル含量が増加した菌株を複数取得した。各菌株を解析した結果、α-イソプロピルリンゴ酸シンターゼをコードする *LEU4* 遺伝子に見出したアミノ酸置換（Ser542Phe, Ala551Val, Gly516Ser）を伴う変異が Leu 高生産の原因であることを明らかにした。また、これらの変異株で醸造した泡盛は親株よりも香味性が向上しており、商品化されている。

２）オルニチン（Orn）高生産変異株の解析と清酒醸造への応用：Orn は肝臓の解毒作用の促進、アルコール性疲労の抑制などの効果が知られており、細菌を用いて発酵生産されている。我々は清酒酵母から分離したプロリン高生産変異株が Orn も高生産することを見出した。Orn 高生産変異株の全ゲノム解析を行った結果、*N*-アセチルグルタミン酸キナーゼをコードする *ARG6* 遺伝子に導入されていたアミノ酸置換（Thr340Ile）を伴う変異が Orn 高生産に寄与することを明らかにした。また、この変異株を用いて醸造した清酒は親株に比べて 3 倍以上のオルニチンが含まれており、商品化されている。

In the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, amino acid metabolism varies under different growth environments and the metabolic styles form a complicated but robust network. There is also crosstalk with various metabolic pathways, products and signal molecules. The elucidation of metabolic regulatory mechanisms and physiological roles for amino acids is important fundamental research for understanding life phenomena. Thus, the development of novel yeast strains that overproduce ‘functional’ amino acids would greatly contribute to food-related industries. This lecture will mainly introduce our research in constructing yeast strains with high functionality and their industrial application as a new breeding technology called “functional amino acid engineering”.

Saccharomyces cerevisiae, amino acid metabolism, brewing yeast

講演番号：4CS-01
講演日時、会場：3 月 21 日 15:15～ ミーティングルーム C

新たな時代における食の健康への貢献

The contribution to health of foods for the new normal era

○山本 万里（農研機構食品研究部門）
○Mari Yamamoto (NARO, Food Res. Inst.)

新型感染症の爆発的な流行により生活様式が急変し内食の需要が急増した。在宅勤務の急増など今までとは異なった環境下では、ストレスの増加、睡眠の不調、生活習慣病の増加などが懸念されており、健康を維持増進する食品の果たす役割が重要性を増している。安定な食糧供給とともに、健康に寄与する“食”を考えることも必要である。ここでは、内食の需要拡大という点から、食材としての機能性農産物の開発現状及び新たな研究について考えたい。まず、今までの研究から開発・上市されてきた、生活習慣病予防のための様々な機能性表示農産物である。骨や目の健康維持、血糖上昇抑制、内蔵脂肪低減、血圧調節、ストレス緩和、認知機能改善などの作用を持つ穀類、野菜、果物、魚、肉、卵が 90 品目以上消費者庁に受理されている。また、我々は新たな研究として、内閣府 SIP にて、「健康寿命の延伸を図る「食」を通じた新たな健康システムの確立」に取り組んでおり、健常人 1000 名の睡眠、自律神経、遺伝子、腸内マイクロバイオーム、食習慣、血液のデータから少し体調を崩した軽度不調を評価する指標の開発や軽度不調を改善する食品の開発を目指しているので紹介する。

The explosive epidemic of new infectious diseases has led to a rapid change in lifestyle and a surge in demand for food at home. Under different circumstances, such as the rapid increase in the number of people working at home, there are concerns about increased stress, poor sleep, and lifestyle-related diseases, and the role of food in maintaining and promoting health is becoming increasingly important. Along with a stable food supply, it is also necessary to consider "food" as a contribution to health. Here, we would like to consider the current state of development of functional agricultural products as food ingredients and new research from the perspective of expanding demand for domestic food. First of all, various functional agricultural products that have been developed for the prevention of lifestyle-related diseases are now on the market. More than 90 cereals, vegetables, fruits, fish, meat, and eggs have been accepted by the Consumer Affairs Agency for their ability to maintain health. As a new research project, we are working on the "The establishment of a new, food-based system for expanding people’s healthy life expectancy” at the Cabinet Office's SIP, and are developing a new indicator for evaluating minor complaints based on sleep, autonomic nervous system, genes, gut microbiome, eating habits, and blood data from 1,000 healthy people. The development and introduction of foods that aim to improve the minor complaints.

minor complaints, food and health, foods with function claims

講演番号：4CS-02
講演日時、会場：3 月 21 日 15:40～ ミーティングルーム C

Covid-19 パンデミックが食品メーカーに及ぼした影響とその対応策、この環境下で農芸化学研究者に期待すること

Impact of Covid-19 on Food Manufacturers and Measures Adopted, and Expected Roles of Agricultural Chemists

○前鶴 俊哉（株式会社ニップン）
○TOSHIYA MAEZURU (NIPPN Corporation)

株式会社ニップンは、1896 年（明治 29 年）に日本製粉株式会社として設立された。製粉事業を中心に事業を展開してきたが、特に昭和 30 年代以降は、パスタ、プレミックス類、冷凍食品、中食関連商品等の事業を着実に拡大させることができた。近年では健康を意識したアマニやセラミド等のヘルスケア商品の開発、販売にも注力しているほか、プレミックス類を中心に海外での展開も図っている。この１月１日に総合食品企業としてさらに発展していくことを目指して社名変更した。

昨年来のコロナ禍の状況では、商品需要や購買行動に大きな変化があり、当社も相応の影響を受けた。端的には内食拡大に伴う家庭用商品の需要増と外食等の減少に伴う業務用商品の需要減である。これらの変動に対しては、安全な食品を安定的に供給するという社会的な責任を最優先に、各食品メーカーとも商品ごとの製造ラインの稼働率を向上させ対応した。一方で低迷した需要に対しては、回復策の検討・実施や、ライン稼働率減少への各種対応を進めた。環境の変化への対応力を試された、かつ試されている状況がまさに今回起こったと考える。

このような状況のもと、それぞれの企業においてコロナ禍での変化への各種対応を実施しているところではあるが、このような状況であるからこそ、「食品」における普遍的な課題にアカデミアと企業が連携しその課題解決に向けて真摯に取り組むことが必要だと思う。特に食品の性状や機能等に多方面からアプローチできる農芸化学分野の役割は重要である。

例えば、消費者の利便性を向上させるための加工性の改善や微生物制御による保存性の向上、各年代において食品本来の機能である栄養を効果的に摂取できる食品の開発・提案、健康に寄与する機能性の高い食品素材の発掘およびそのエビデンスの蓄積、おいしさへの科学的なアプローチ等、幅広い分野でやれること、やるべきことは多い。研究者の益々の活躍を期待したい。

Type your abstract here.

Founded in 1896, NIPPN CORPORATION is a Japan's leading manufacturer of flour, pasta, premix, frozen foods, ready-made meal and health care products. Amid the Covid-19 pandemic, we faced with many challenges to fulfill our corporate social responsibility, i.e., procuring stable supply of foods, meeting growing customers' demands, etc. In this context, the Industry-Academy collaboration in the field of Agricultural Chemistry is becoming even more important as means to make multifaceted approaches to contribute to the improvement of the food industry as a whole.

food technology, functional food, collaborative research

講演番号：4CS-03
講演日時、会場：3 月 21 日 16:05～ ミーティングルーム C

調味料生産分野での役割

Role of seasoning manufacturers

○北倉 芳久（キッコーマン食品株式会社）
○Yoshihisa Kitakura (Kikkoman Food Products Company)

キッコーマンはしょうゆをはじめとする調味料、惣菜のもと、飲料、豆乳などを生産している。2020 年 3 月中旬以降、日本国内での感染が激しくなり、万が一工場に感染者が発生したら生産がストップしかねない状況に陥った。幸い、当社グループでは農芸化学出身者をはじめとする生物学の知識をもつ人材が各工場でリーダーシップをとっており、工場従業員を感染から守る活動を主導した。

当初はスーパーマーケットの店頭からマスクや弊社が生産するトマトケチャップ、うちのごはんという簡便総菜の素が売り切れる、という緊急事態も発生した。

その後、恒常的に在宅勤務が増え、職場の飲み会が減るなどが社会の趨勢となり、家族そろって自宅で食卓を囲む場面が見慣れた風景となったと思われ、弊社では業務用の売上高減、家庭用の売上高増が続くようになった。この状況は日本に限らず世界的なものである。家庭での調理を家族で楽しみ、家族そろって食事をし、家族での団らんを楽しむ、という食生活は、もしかしたら古くから続く伝統的な家庭での食卓の姿なのかもしれない。

コロナ禍は人々の考え方に多大な影響を与え、働き方改革の進展、仕事や人生に対する考え方への反省の結果、コロナ禍が終息しても元の生活スタイルには戻らないと予想される。具体的な予測は難しいが、家庭での調理や団らんが生活の満足度に対して重要性を増すなどの変化が予想される。

好景気にわく社会では、手間暇かけたおいしい食事を楽しみたいときには外食や旅行が多用されたのではなかろうか。その場面では「素材にこだわる職人による手作り」がもてはやされたと思う。その場面では食品加工の出番はあまり感じられなかった。しかし、ふだんの食卓も重要視されるアフターコロナの時代では、加工度の比較的高い食品のおいしさが食の満足に直接つながることが予想される。食品加工技術をフルに活用した「缶詰類」を代表とする１）保存性が高く、２）調理に時間がかからず、３）健康によい、４）しかもおいしい、食品への要望が高まるはずと考えられる。このような加工食品の製造にあたっては「テクノロジーを駆使」して生産されることが多いので、農芸化学分野の食品化学や食品工学が大いに活躍する場面が増えるであろう。調味料を生業とする弊社もその分野にも貢献できるよう技術を磨く所存である。

COVID-19 pandemic has changed the life style of people. We, processed food manufacturers, have to attach ourselves to the new life style. Our process needs food processing technology and that is what we can devote our agricultural knowledge to.

Kikkoman, processed food, new life style

講演番号：4CS-04
講演日時、会場：3 月 21 日 16:35～ ミーティングルーム C

新型コロナ禍から食品企業が学ぶべきこと
What to learn from novel coronavirus for food companies

○秦 洋二（月桂冠（株））
○Yoji Hata (Gekkeikan Sake Company)

新型コロナウイルスの感染拡大は、食品を製造する企業の活動に大きな影響を与えた。社員の行動が著しく制限され、生産活動、営業活動ともに従来の方法を大きく見直さざるを得ない状況に追い込まれた。在宅勤務によるリモートワークはもとより、感染防止ために必要な多くの新たな対策を導入することが求められた。ただ企業はこのコロナ禍を経験したことによって、新たな変革のチャンスをつかむことができている。

（１）働き方改革の推進 これまでも働き方改革の推進が行われてきたが、このコロナ感染の感染防止のために、ほとんどの企業が働き方の自由度を拡大せざるを得なくなった。そして時間や場所にとらわれなくても問題なく業務を進められることを多くの企業が知ることとなった。

（２）デジタル化への加速 人間の移動が制限される中、場所の制限を受けないデジタル情報の有用性がますます高まることになった。これまでのペーパーレス化のような部分的な取り組みが、企業の情報をすべてデジタル化しそれを有機的に結合するようなＤＸへと加速化してくことになる。

（３）アフターコロナでのビジネスチャンス　アフターコロナは以前の社会に戻るのではなく、新しい社会の始まりと言われている。例えば研究開発においても場所を選ばない研究活動が可能となる。これまでもオープンイノベーションなど R&D のフラット化が進められていたが、今後はさらにどこでも、誰でも参画できるオープンイノベーションが可能になると思われる、アフターコロナの新しい社会で生まれるビジネスチャンスをどのようにとらえるかがこれらかの企業の勝敗を左右する。

The spread of the novel coronavirus has had a major impact on the activities of food manufacturers. The behavior of employees was severely restricted, and both production and sales activities were forced to undergo a major overhaul of conventional methods. In addition to remote work at home, it was required to introduce many new efforts necessary to prevent infection. However, companies have been able to find new opportunities for change by experiencing corona infection.

(1) Forced promotion of work style reform
(2) Acceleration to digital transformation
(3) Business opportunity after corona infection

novel coronavirus, digital transformation, buisiness opportunity

講演番号：4CS-05
講演日時、会場：3 月 21 日 17:00～ ミーティングルーム C

これからのフードシステムの課題と新型コロナ感染症

Examination of the food system; Under COVID-19 and in the future

○新山 陽子（立命館大学）
○Yoko Niiyama (Ritsumeikan Univ.)

食料の供給と消費のシステム（フードシステム）は、農業、食品製造業、農産物・食品卸売業、外食産業、小売業、消費者/市民から成り立っている。新型コロナ感染拡大のなかでのその役割と課題を、調査も踏まえ、社会科学視点から捉え、農芸化学分野の研究との接合を図りたい。

まず、1）生命を支えるために、フードシステム関係者は強い使命感をもって業務にあたっている。特にシステム両端をつなぐ生鮮食品の製造、卸売段階の努力は大きい。地震などの大災害時にも維持は必須であり、クライシス時のシステムの頑健性（ロバストネス/復元力）確保の方途が論じられるようになった。一方、2）消費については、社会行動の抑制から外食の減少は顕著であるが、家庭内消費の内容は、家事のジェンダー性をも含め、慣性的であることが見出せる。むしろ、3）新しいシステムに向かって考慮すべきは、コロナ以前にすでに見通せていた課題：目前に迫る都市の超高齢化と食料へのアクセス問題、基幹農業従事者の激減（高齢リタイヤ）による農業生産維持の困難、大量生産・大量流通による効率化・低コスト化と裏腹の負の外部性（環境負荷、食の均質化、地域経済の脆弱化）の発現である。構造的問題、クライシスの現れ方は地域によって異なり、新型コロナ感染症対策でもそうであるが、地域の状況に応じた臨機応変な対応力の形成が必要である。すべての人に安全で、多様、良質な食料を持続的に供給できるよう、自治体、事業者、人々の手による地域圏フードシステムの構築が求められよう。フランスなどでは国をあげて取り組みが進んでいる。

The food system consists of agriculture, food manufacturing, wholesale, food service, retail, and consumers. The report examines the role and challenges of the food system in the expansion of COVID-19 from a social science perspective. 1) Food system actors work with a strong sense of mission to support people's lives. Maintaining the system is essential even in times of major disasters such as earthquakes, and methods for ensuring the robustness/resilience of the system have been discussed. 2) The decrease of eating out is remarkable due to the suppression of social behavior, while domestic consumption is found to be inertial. 3) Rather, the new system requires consideration of the following issues: access to food amid the super-aging population in urban areas, difficulties in maintaining agriculture due to a sharp decline in the number of farmers, and negative externalities due to mass production and distribution (environmental impact, food homogenization, and weakening regional economies). It is necessary to build a territorial food system according to the local situation so that all people can be supplied with safe, diverse, and good-quality food in a sustainable manner.

response to the crisis of the food system, robustness, territorial food system

講演番号：4DS-01
講演日時、会場：3 月 21 日 15:10～ ミーティングルーム D

超低栄養性細菌はどのようにして栄養を得ているのか？
How do super oligotrophs derive nutrients?

○吉田 信行（静大院・総合科技）
○Nobuyuki Yoshida (Shizuoka Univ.)

極めて低い栄養条件で生育可能な細菌群を**低栄養性細菌**（貧栄養性細菌，オリゴトローフ）と呼ぶことがある．その栄養条件に明確な定義はないが，私たちは生育に必要な炭素源濃度を 1 mg/L として低栄養性細菌の検索を試みている．自然界から単離した低栄養性細菌のうち，奇妙な生育を示す *Rhodococcus erythropolis* N9T-4 株を発見した．N9T-4 株は炭素源を完全に除いた培地上で，非独立栄養条件でも３，４日でコロニーを形成する．その後の検討で，**窒素源および硫黄源**を除いた培地上でも良好な生育を示すことが分かった．また，N9T-4 株の培養条件を参考に改めて自然界から検索すると，驚くほど容易に同様の生育を示す細菌（**超低栄養性細菌**）を単離することができた．

超低栄養性細菌はどのように栄養を得ているのか？正直なところ，炭素代謝についてはよく分かっていない．初期の頃から大気中の CO_2 **を細胞構成成分**に取り込んでいることは確かめられていたが，N9T-4 株ゲノム上には既知の独立栄養的 CO_2 固定系の遺伝子は存在せず，細胞内に新規な CO_2 固定反応もこれまで見いだせていない．トランスクリプトームおよびプロテオーム解析の結果，それぞれ **NDMA 依存性メタノール脱水素酵素**と **NAD 依存性アルデヒド脱水素酵素**をコードする *mnoA* および *aldA* が，N9T-4 株の低栄養生育に重要であることが分かっている．これらの遺伝子がどのように低栄養生育に関与しているのか？その他，これまでに判明していることを紹介し，超低栄養性について議論したい．

An oligotroph is a microorganism that can grow at very low concentrations of nutrients. We defined the oligotroph as one that can grow on a medium containing 1 mg of carbon per liter, and have isolated the oligotrophs from various environments. *Rhodococcus erythropolis* N9T-4 is a super oligotroph that can form its colonies on a minimal medium without any additional carbon, nitrogen, and sulfur sources. In addition, energy sources (e.g. light and molecular hydrogen), which are required for autotrophs, are not needed for the oligotrophic growth of N9T-4. Transcriptomic and proteomic analyses in N9T-4 revealed that *mnoA* and *aldA* encoding an NDMA-dependent methanol dehydrogenase and an NAD-dependent aldehyde dehydrogenase, respectively, were upregulated under the oligotrophic conditions. How are these genes involved in the oligotrophy of N9T-4? In this symposium, I would like to show the knowledge about N9T-4 thus far and discuss the mystery of the super oligotrophs.

oligotroph, *Rhodococcus erythropolis*, carbon dioxide

講演番号：4DS-02
講演日時、会場：3 月 21 日 15:35～ ミーティングルーム D

従属栄養細菌の極貧栄養環境での CO_2 依存的な増殖現象

CO2-dependent high-yield growth of a heterotrophic bacterium under oligotrophic conditions

○永田 裕二（東北大生命科）
○Yuji Nagata (Tohoku Univ.)

有機塩素系殺虫剤分解細菌 *Sphingobium japonicum* UT26 株は生育に有機炭素源を必要とする従属栄養細菌であり、独立栄養細菌の CO_2 固定機構の鍵酵素遺伝子ホモログは有していない。我々は、有機炭素源非添加の無機固体培地で活発に増殖する本株のトランスポゾン変異株を見出した。本現象を high-yield growth under oligotrophic conditions (HYGO) 表現型と命名して解析を進め、(i) Zn-dependent alcohol dehydrogenase (ADH)と有意な相同性を示すタンパク質をコードする遺伝子 (*adhX*) の高発現が HYGO の直接的要因であること、(ii) HYGO は CO_2 依存的であり、CO_2 の取り込みを伴うこと、(iii) AdhX は ADH 活性を有し、ADH 活性の強さと HYGO に相関関係があること、を明らかにした。一方、*adhX* を高発現する HYGO 突然変異株は spontaneous にも出現し、*adhX* とほぼ同一の遺伝子が UT26 株が属する sphingomonads 細菌群の他株にも見出されることから、本現象は sphingomonad 細菌群の重要な極貧栄養環境適応機構であると示唆される。本現象の機構は未解明であるが、新規な CO_2 固定機構の存在が示唆されると共に、有用細菌の効率的利用や有害細菌の増殖抑制など、応用への展開も期待される。

Sphingobium japonicum strain UT26 is a heterotrophic bacterium that needs organic carbon sources for its growth and has none of the genes for the key enzymes in autotrophic CO_2 fixation pathways identified to date. We found a transposon-induced mutant that grew well on a minimal salt agar medium prepared without adding any organic carbon sources. We refer to this phenotype as the high-yield growth under oligotrophic conditions (HYGO), and demonstrated that (i) expression of the *adhX* gene encoding putative Zn-dependent alcohol dehydrogenase (ADH) induced the HYGO phenotype, (ii) the HYGO phenotype was CO_2 dependent and accompanied with CO_2 incorporation, and (iii) AdhX showed ADH activity and it was correlated with the HYGO phenotype. The *adhX*-expressing HYGO mutants spontaneously emerged, and almost identical *adhX* homologues were found in other sphingomonad strains, suggesting that the *adhX*-mediated HYGO phenotype may be an important adaptation strategy to oligotrophic environments among sphingomonads. Although the mechanism of HYGO remains unknown, a novel CO_2 fixation system may be involved in it. Furthermore, the HYGO phenotype can be applied to cost-effective cultivation of useful bacteria and prevention of contamination by oligotrophs.

oligotroph, CO2 fixation, sphingomoads

講演番号：4DS-03
講演日時、会場：3 月 21 日 16:00～ ミーティングルーム D

Revival of aerobic microbial life from up to 101.5 million-years-old oxic sediments of South Pacific Gyre

○Yuki Morono[1], Motoo Ito[1], Tatsuhiko Hoshino[1], Takeshi Terada[2], Tomoyuki Hori[3], Minoru Ikehara[4], Steven D'Hondt[5], Fumio Inagaki[6] ([1]JAMSTEC Kochi, [2]Marine Works Japan, [3]AIST, [4]Kochi Univ., [5]Rhode Island Univ., [6]JAMSTEC MarE3)

During the Integrated Ocean Drilling Program (IODP) Expedition 329, we observed the presence of aerobic microbial communities and dissolved oxygen throughout the sedimentary sequence from the seafloor to the sediment-basement interface at all sites we explored in the South Pacific Gyre (SPG) [1]. This finding indicated that the sedimentary biosphere in the oligotrophic ocean region has no depth limit and continues down to the basement. However, the physiology of these aerobic microbial communities, including substrate metabolism remain poorly constrained. Here we show that diverse aerobic members of communities in SPG sediments (4.3-101.5 Ma) are capable of readily incorporating carbon and nitrogen substrates and dividing. Most of the 6986 individual cells analyzed with nanometer-scale secondary ion mass spectrometry (NanoSIMS) actively incorporated isotope-labeled substrates. Many cells responded rapidly to incubation conditions, increasing total numbers by 4 orders of magnitude and taking up labeled carbon and nitrogen within 68 days after incubation. The response was generally faster (on average, 3.09 times) for nitrogen incorporation than for carbon incorporation. In contrast, anaerobic microbes were only minimally revived from this oxic sediment. Our results suggest that microbial communities widely distributed in organic-poor abyssal sediment consist mainly of aerobes that retain their metabolic potential under extremely low-energy conditions for up to 101.5 Ma..

[1] D'Hondt, S. et al., Nature Geoscience, 8(4), 299-304, 2015.

Subseafloor Biosphere, Substrate Assimilation, Stable Isotopes

講演番号：4DS-04
講演日時、会場：3 月 21 日 16:25～ ミーティングルーム D

身近に生息する貧栄養細菌と衛生学的問題

Oligotrophic bacteria that inhabited in our daily environments, and hygienic problems

○古畑 勝則（麻布大　生命・環境科学）
○Katsunori Furuhata (Azabu Univ.)

ウォーターサーバーとは、家電本体にボトルやバッグをセットして冷水や温水を使用できる機材である。2011 年の東日本大震災以来、ペットボトル水を非常用飲料水として備蓄する傾向にあるが、これに代わり、これまでオフィスを中心に普及してきたウォーターサーバーが一般家庭用として急激に増加している。こうしたウォーターサーバー水は、まったく消毒されず、水道法にも食品衛生法にも該当しないため、通常の使用方法でも従属栄養細菌が増殖する可能性が危惧された。今回は、演者らが行ったウォーターサーバー水の細菌検査結果や分離株に関する情報を提供する。

バイオフィルムは、多種多様な微生物から構成される高次構造体であることが知られている。微生物はバイオフィルムを形成することによって、好ましい生育環境に滞留し、お互いに情報交換しながら自らの役割を果たしつつ、様々な外的攻撃から身を守っている。バイオフィルムの発生は特殊な現象のように考えられるが、それは我々人間の視点であり、この現象を微生物生態学的に微生物の視点でとらえると、ごく自然な現象であって、バイオフィルムは“微生物のすみか”ともいえる。身近な環境において、分野、領域を問わず、水分の存在する場所ではバイオフィルムが発生すると考えてほぼ間違いない。今回は、身近な住環境に発生するバイオフィルムについて発生状況や分離株の特性について概説する。

A water server is an appliance used with bottles and bags to dispense cold or hot water. The use of water servers, which to date have gained popularity centering mainly in offices, has recently seen a rapid increase in general household use. Because the water in water servers is not disinfected at all, heterotrophic bacteria may grow even under normal use. We herein provide information on our bacterial test results and the characteristic of isolates from water in a water server.

Biofilms are known to be higher-order structures composed of a wide variety of microorganisms. By forming biofilms, microorganisms remain in favorable habitats and protect themselves from various external attacks while exchanging information with each other, and playing their own roles. This time, we outline the biofilms generated in familiar living environments.

heterotrophic bacteria, water server, biofilm

講演番号：4DS-05
講演日時、会場：3 月 21 日 16:50～ ミーティングルーム D

乾燥環境下で生残する食中毒細菌の挙動

Survival of foodborne pathogenic bacteria under desiccation environments

○小関 成樹（北大農）
○Shigenobu Koseki (Hokkaido Univ.)

微生物にとって重大なストレスとして「乾燥」がある。乾燥環境下においても 2~3 年以上もの長期間にわたり生残し続ける（増殖はしない）細菌が数多く報告されている。このような性質を有する食中毒細菌を原因とする食中毒事故が世界各地で頻発しており，それら事故の主な原因食材は，ナッツ類，チョコレート，シリアル等の一般的には食中毒とは無縁に思える乾燥した食材である。演者はサルモネラ属菌をはじめとする食中毒細菌の死滅が乾燥環境下において，保存環境中の水分活性条件によらず 5℃程度の低温での保存中には極めて緩やかで，安定して 1 年以上にわたり生存し続けること見出した。一方，水分活性が比較的高い（0.6-0.8）保存条件において，37℃前後の増殖至適温度下では速やかに死滅することを確認した。これらの死滅挙動の違いを明らかにするために，細菌細胞の物性変化面からのアプローチとして，細菌細胞のガラス転移現象に着目して研究を進めた結果，低水分活性状態においてサルモネラ属菌のガラス転移温度が 70℃以上であることを見出した。一方で，水分活性の上昇に伴い，ガラス転移温度が 40℃程度にまで低下することを明らかにした。このように，細菌細胞のガラス転移温度と水分活性との関係性を定量的に評価することに成功した。したがって，乾燥環境下における細菌細胞の生残，死滅挙動を予測するための新たな評価パラメータとして，ガラス転移温度が重要な役割を果たすことを明らかにした。

Food borne illnesses caused by foodborne pathogenic bacteria frequently occur all over the world, and the main causative foods of these illnesses seem to be generally unrelated to food poisoning such as nuts, chocolate, and cereals. The author found that the survival kinetics of foodborne pathogenic bacteria such as *Salmonella enterica* spp. was slow and stable during storage at low temperature (5°C) regardless of the water activity (a_w) conditions. While *S. enterica* enables to survive for more than a year under fridge temperature regardless of the storage a_w, the death of *S. enterica* was pronounced within one month at high a_w (0.6-0.8) and higher temperature of 37°C conditions. In order to clarify the difference of the survival behaviors, as an approach from the aspect of changing the physical properties of bacterial cells, we focused on the glass transition phenomenon of bacterial cells. The glass transition temperature of dried *S. enterica* cells ($a_w < 0.6$) was determined around 70°C or higher. In contrast, the glass transition temperature of *S. enterica* cells with higher a_w (> 0.8) showed around 40°C. Thus, the glass transition temperature plays an important role as a new evaluation parameter for predicting the survival and death behavior of bacterial cells in a dry environment.

water activity, glass transition temperature, dry food

講演番号：4ES-01
講演日時、会場：3 月 21 日 15:00～ ミーティングルーム E

電気を感じるバクテリア: 電気化学活性細菌の電位応答機構とその応用

Electrochemically active bacteria sense electrode potentials

○高妻 篤史、廣瀬 篤弥、渡邉 一哉（東薬大生命）
○Atsushi Kouzuma, Atsumi Hirose, Kazuya Watanabe (Tokyo Univ. Pharm. Life Sci.)

近年の研究により、ある種の細菌は細胞外の導電性固体（電極）と電子の授受を行う能力を持つことが明らかになってきた。このような細菌は電気化学活性細菌（electrochemically active bacteria; EAB）とよばれており、その特異な能力から学術的な興味の対象であるとともに、微生物燃料電池（EAB によって有機物等の化学エネルギーを電気エネルギーに変換する装置）や、電気制御発酵（EAB の細胞内酸化還元バランスを電極によって制御し、発酵生産を促進させる手法）等の有用プロセス（微生物電気化学システム）への応用が期待されている。これらのプロセスは EAB のエネルギー代謝に基づくものであるため、その高効率化には EAB の代謝活性を適切に制御することが重要となる。

我々は EAB の代謝活性と電流生成を制御するための分子生物学基盤を確立することを目的に、モデル EAB である *Shewanella oneidensis* MR-1 株の代謝制御機構に関する研究を行ってきた。そのなかで、我々は MR-1 株が電極の電位を感知し、遺伝子発現と代謝を変化させる能力をもつことを発見した（Hirose et al., 2018 *Nat Commun* 9:1083）。この能力を応用すれば、電極を用いて生物の遺伝子発現を制御する手法を開発できる可能性がある。我々はこの手法を電気遺伝学（electrogenetics）と命名し（Hirose et al., 2019 *Biotechnol Adv* 37:107351）、その基盤確立と微生物電気化学プロセスへの応用を目指して研究を行っている。本講演では MR-1 株の電位応答機構と電気遺伝学の原理について紹介する。

Electrochemically active bacteria (EAB), capable of electrochemical interactions with electrodes via extracellular electron transfer (EET) pathways, have attracted significant attention due to their utility in environment-friendly bioelectrochemical systems (BESs), including microbial fuel cells and electro-fermentation systems. Given that the electrochemical activity of EAB is associated with their energy metabolism, the regulation and enhancement of the metabolic activity of EAB are important for the development of more efficient BESs.

To establish the molecular basis for controlling the metabolic and electrochemical activity of EAB, we have investigated molecular mechanisms by which a model EAB, *Shewanella oneidensis* MR-1, regulates the expression of catabolic and EET-related genes. Notably, we recently found that MR-1 can sense electrode potentials, thereby altering catabolic pathways via the transcriptional regulation of associated genes (Hirose et al., 2018 *Nat Commun* 9:1083). This finding suggests that electrodes can be used for regulating gene expression and metabolism in living cells. We proposes this methodology, termed “electrogenetics”, as a novel biotechnology platform that facilitates the application of EAB in useful biotechnology processes.

electrode, gene expression, regulation

講演番号：4ES-02
講演日時、会場：3 月 21 日 15:30～ ミーティングルーム E

地下圏における電気微生物の探索と電気メタン発酵

Exploring subsurface electric microbes and their electro-methanogenesis

○石井 俊一 (海洋研究開発機構)
○Shun'ichi Ishii (JAMSTEC)

現在の地球上には、10^{29} ～10^{30}個とも言われる膨大な数の微生物が存在しており、そのうちのかなりの部分が、海洋地下圏や土壌地下圏に存在していると言われている。地下圏は、鉱物に富んだ環境であるため、鉱物と微生物間の直接電子授受によりエネルギーを得る『電気微生物』が多数存在していると考えられる。本研究では、田んぼ土壌、海底堆積物、鉱泉などに生息する地下圏微生物群を植種源として、電極を介した電気培養を行い、地下圏に住む電気微生物の探索を行った。その結果、どのような環境からも多様な発電菌や電気合成菌の集積が確認された。メタオミクス解析による電気活性微生物群のゲノムおよび機能遺伝子の同定を行なったところ、様々な電極電位に対し、多ヘム型のシトクローム C を駆使して菌体外電子授受反応を完遂している事が分かった。

次に、地下圏の多様な電気活性微生物を用いた物質生産法として、電気メタン合成反応に着目した。南関東ガス田のメタンは、地下圏の微生物活動由来である事が分かっており、地下圏に生息するメタン菌が CO2 固定・メタン生成の『触媒反応』を担っている。これらの地下圏微生物のメタン生成活性を電気により促進可能であるかを試験したところ、陰極上に、電子を受け取ってメタン生成する電気メタン合成微生物群集を集積する事ができた。このバイオプロセスは、CO2 固定・資源化（Carbon Capture and Utilization, CCU）の一つとしての応用が期待される。

On the earth, a large part of microbes is living in the marine and soil subterranean areas. Since these environments rich in minerals, many ″electric microorganisms″ can be existed. Here, we explored for electric microorganisms living in the underground area by using bioreactor with electrodes. As a result, various electrogenic and electrotrophic microbes were accumulated from various environments. Then, we identified the genomes and functional genes of the electric microbes by MetaOmics analyses, and the extracellular electron transfer reactions were performed by using different types of multi-heme c-type cytochromes. Next, we studied on the electro-methanogenesis in the subterranean areas. The subterranean electromethanogenic microbes were successfully promoted by electricity. This electromethanogenic bioprocess is expected to be applied as one of the CO_2 fixation and utilization (CCU) technologies in near future.

Electro-methanogenesis, Carbon Capture and Utilization (CCU), MetaOmics

講演番号：4ES-03
講演日時、会場：3 月 21 日 16:00～ ミーティングルーム E

地域資源バイオマスを利用した微生物燃料電池

Electricity Generation from Regional Biomass by Microbial Fuel Cells

○井上 謙吾（宮崎大農）
○Kengo Inoue (Miyazaki Univ.)

微生物燃料電池は、電極へ電子を伝達できる微生物（「電気化学活性微生物」の中でも「発電菌」と呼ばれる）を利用した技術であり、微生物を用いて有機化合物の化学エネルギーを直接電気エネルギーに変換する技術である。極めて多様な有機化合物を利用できるため、有機性廃棄物の処理と発電を同時に行う技術として国内外で実用化に向けた精力的な研究開発が進められているが、実用化・商品化された例は極めて少ない。概して微生物燃料電池は発電量が低いため、発電技術というよりも省エネ型の有機性廃棄物処理技術としての実用化に可能性が見いだされている。これまでに、講演者の研究グループは畜産廃棄物、及び醸造廃棄物を利用した微生物燃料電池について研究開発を行ってきた。

環境汚染・近隣住民への配慮のために必要な畜産廃棄物処理が徹底されるべきであるが、処理コストが畜産農家の経済状況を逼迫させている側面がある。畜産廃棄物の処理に微生物燃料電池を用いることで、処理コストを低減する技術としての実用化が期待されている。また、宮崎県は、古くから焼酎（主に芋焼酎）の生産が盛んであるが、それに伴い、生産される焼酎の約 2.5 倍の焼酎粕が発生する。焼酎粕は酸性度が高く、有機物濃度も極めて高いため、適切な処理が必要である。講演者のグループは、微生物燃料電池を用いることでその処理と発電が可能であることを見いだした。酸性廃棄物の処理に微生物燃料電池が用いられた例は少なく、発電時の電池内部の微生物群集構造について解析したところ、他の pH 中性付近の廃棄物を利用した微生物燃料電池とは異なり、*Clostridium* 属細菌を中心とした処理と発電が行われていることが明らかになった。

Redox active microorganisms, which transfer or accept electrons form electrodes, are called "electroactive microorganisms". Electroactive microorganisms can produce electricity by transferring electrons from organic waste to the electrodes in microbial fuel cells (MFCs). The organic waste also can be treated by the MFCs during its electricity generating process. Among the organic waste, livestock wastes and brewery wastes were examined for electricity generation and treatment by MFCs. COD removal, chemical composition, and microbial community structures during the MFC operations were analyzed.

Microbial fuel cell, Electro active microorganism, Organic waste

講演番号：4ES-04
講演日時、会場：3 月 21 日 16:30～ ミーティングルーム E

微生物と固相間の電子授受が引き起こす金属腐食

Iron corrosion induced by electron transfer from metal to microorganisms

○平野 伸一（電中研）
○Shin-ichi Hirano (CRIEPI)

固相（電極）と微生物間の電子授受を利用し微生物を制御する微生物燃料電池や微生物電気合成に対して、微生物が固相（金属）上での電気化学反応に作用することで金属を劣化させる現象として微生物腐食（Microbiologically Influenced Corrosion）が報告されている。設備劣化を引き起こす金属腐食はこれまで主に化学・材料の側面から対策が講じられてきたが、化学的な腐食を受けづらい環境（中性・常温・常圧、嫌気）においても微生物腐食は急速な腐食や局所腐食を引き起こし、経済的損失を生じうることから設備保全のために適切な対策手法の確立が必要となっている。しかし、腐食を引き起こす微生物の種類およびその腐食メカニズムの情報は限定的であり、対策立案の基盤となる知見が不足している。近年、硫酸還元菌やメタン菌、酢酸菌において鉄など固体金属を電子供与体として増殖可能な微生物が報告され、これらは金属−微生物間の電子授受が直接腐食関与することから電気微生物腐食（Electric-MIC, EMIC）と呼ばれている。微生物による腐食を明らかにする観点においても固相と微生物間の電子授受反応を電気化学的に理解し、対策することの重要性が高まっている。本発表では、電力関連設備で発生した微生物が関与すると考えられる腐食の事例を紹介するとともに、海洋環境より単離した鉄腐食性硫酸還元菌が引き起こす EMIC 反応を電気化学的に解析した結果をもとに腐食対策に向けた将来展望について議論したい。

Microbiologically Influenced Corrosion (MIC) is a phenomenon that microbes induce metal corrosion. It has been reported that microorganisms cause severe damage for industrial equipment even under mild environments where it is difficult to receive chemical corrosion (neutral, normal temperature, normal pressure, anaerobic). Although it is urgent to establish an appropriate mitigation method from MIC for equipment maintenance, information on the mechanism of MIC is limited. In recent years, microorganisms can grow using iron as electron donors in sulfate-reducing bacteria, methanogens, and acetogens have been isolated. These microorganisms induce severe iron corrosion via direct metal-microorganisms electron transfer, and this type of corrosion was designated as EMIC (Electric-MIC) Therefore, it is becoming more important to understand the electron transfer reaction between the solid phase and microorganisms. In this presentation, we will introduce possible MIC examples in equipment relating electric power industry, and also electrochemical analysis of EMIC by iron-corrosive sulfate-reducing bacteria isolated from the marine environment.

corrosion, sulfate reducing bacteria, electron

講演番号：4ES-05
講演日時、会場：3 月 21 日 17:00～ ミーティングルーム E

環境や人体に棲むブラック電気細菌

Harmuful electrogenic bacteira are ubiquitous

○岡本 章玄 [1,2] ([1] 物材研、[2] 北大理)
○akihiro okamoto[1,2] ([1]NIMS, [2]Hokkaido Univ.)

細菌は発酵食品や抗生物質などの恩恵をもたらしてくれる場合もあるが、感染症などの害をなす「ブラック」な性質を持つものもいる。最近では、アルツハイマー病に関連するものや、鉄を腐食させてパイプラインの破損事故の直接的な原因となるものも報告されており、益々ブラック細菌のヒト・材料・環境との関わりが注目されている。本発表では、中でも人知れず電子を操る「電気細菌」の能力を持ち、巧みに利用してきたことが暴かれつつある「ブラック電気細菌」の電子移動メカニズムに関しての研究を紹介する。「電気細菌」は、細胞の外側にある電極やミネラルなどの固体材料との間で電子を流すことで生きることができる。この微生物をまるで電極触媒のように使うことで、電気を作りながら廃水処理を行う「微生物燃料電池」や、CO_2から有用物質を作る「微生物電極合成」といった魅力的なバイオプロセスを実現することが可能になる。報告されている電気細菌の多くは有用に活用されている。一方で、有害な細菌群に関しての電子移動機構に関しては、世界的にも研究が始まったばかりであるが、有用菌では見られなかった特徴的なメカニズムで電子を操り、しかも細菌の有害性を高める働きがあることがわかってきた。当日は、ブラック細菌が導電性ナノ粒子を利用して鉄腐食を加速させる機構や、口腔・腸内から特定された電流生成能を持つ病原細菌に関して詳細に議論する。

Bacteria provide benefits such as fermented foods and antibiotics, but some have harmful properties to induce Alzheimer's disease or pipeline breakage accidents by corroding steel. In this presentation, we will introduce our research on the electron transfer mechanism of harmful electric bacteria having the ability to manipulate electrons. Harmful electric bacteria can live by transferring electrons to and from electrodes, minerals, and other solid materials on the outside of their cells. By using these microorganisms as electrocatalysts, it will be possible to realize fascinating bioprocesses such as microbial fuel cells, which treat wastewater while producing electricity, and microbial electrosynthesis, which produces useful substances from CO_2. Many of the reported electric bacteria have been beneficial. In contrast, the electron-transfer mechanism of harmful bacteria has only just begun to be studied worldwide, but it has been found that they manipulate electrons by a characteristic mechanism that has not been seen in beneficial bacteria, and they also increase the harmfulness of bacteria. In this session, we will discuss the mechanism of accelerating iron corrosion using electrically conductive nanoparticles and the electrogenic pathogen in the oral cavity and intestine.

extracellular electron transfer, pathogen, microbially influenced corrosion

講演番号：4FS-01
講演日時、会場：3 月 21 日 15:00～ ミーティングルーム F

「Non-conventional yeasts の世界」　新産業酵母研究会の１０年を振り返って

Non-Conventional Yeasts for Industry - Introduction

○高木 正道（新潟薬科大学)
○Masamichi Takagi (Niigata University of Pharmacy and Applied Life Sciences)

本シンポは「新産業酵母研究会」（Meeting for Industrial Non-Conventional Yeasts=MINCY）が主体となり企画したものである。MINCY は１０年前の 2011 年に立ち上げたもので、多様な酵母の利用を目指し、年２回の例会で各回に４題の講演を行ってきた。従来の酵母研究がいわゆる *S. cerevisiae* などごく少数の conventional 酵母に焦点を当て、アルコール発酵に関連する研究か、真核生物のモデルとしての研究（**生物の共通性を基盤とした貫く研究**）が中心であった。これに対し、MINCY は多様な酵母の産業利用を目的とした研究に焦点を当てた**生物の多様性を基盤とした連ねる研究**を目指している。本シンポでは、これまでに例会で発表された多くの研究の中から、日本農芸化学会が目指す「人間と地球環境の健康」と関連してバイオテクノロジーで特に広く注目されるものを取り上げ、１つのシンポとしてまとめたみたい。

私の報告はこのシンポのイントロとして、MINCY１０年で発表されてきた講演内容を振り返ってみるが、まず酵母が菌類の進化の過程でどのような遺伝子の変化によって誕生してきたのか、に関する現代の分子遺伝学の研究成果を紹介し、そのようにして誕生した多様な酵母の中で、どのような特徴を持つ酵母が産業的に利用価値の高いものとして拾い出されて MINCY で発表されたのか、をまとめてみたい。そのような特徴的な酵母では、酵母という細胞形態で自然界を生きていく中で、やはり何か特徴のある遺伝子に変化が生じてきたものと考えられる。

なお、真核微生物の中には、酵母以外にも従来余り注目されてこなかった(non-conventional)が産業利用の面から有望な微生物も存在することが期待されるので、将来は MINCY を Meeting for Industrial Non-Conventional Eukaryotic Microorganisms=MINCEM として拡大・発展させ、菌類（糸状菌、キノコ）や原生生物（微細藻類などの単細胞真核微生物）に関する研究も取り上げていく可能性も考えていきたい。

MINCY(Meeting for Industrial Non-Conventional Yeasts=MINCY）was established in 2011, and since then 4 scientific papers have been presented in the regular meeting each year.
In this symposium titled “Non-Conventional Yeasts for Industry", several papers among those published in MINCY so far are selected and presented.

MINCY, Non-Conventional Yeasts, Industry

講演番号：4FS-02
講演日時、会場：3 月 21 日 15:25～ ミーティングルーム F

担子菌酵母によるバイオ界面活性剤の生産と産業利用

Production of biosurfactant by basidiomycetous yeast strains

○森田 友岳、雜賀 あずさ (産業技術総合研究所)
○Tomotake Morita, Azusa Saika (AIST)

担子菌門に属する担子菌酵母は、様々な物質を生産する微生物資源として産業利用が期待されている。例えば、クロボキン亜門に属する *Pseudozyma* 属酵母（近年一部は *Moesziomyces*、*Sporisorium* 属に改名）は、有機酸、脂質、糖脂質等を生産することが知られている。発表者らはこれまで、*Pseudozyma* 属酵母が生産する糖脂質で、バイオ界面活性剤の一種であるマンノシルエリスリトールリピッド (MEL) に着目し、MEL の生産や機能解析に関する研究を進めてきた。その結果、*Pseudozyma tsukubaensis* が生産する MEL に優れた皮膚保湿効果があることを見出し、化粧品用素材としての産業化を実現した。本発表では、*P. tsukubaensis* 遺伝子組換え体の作製及び MEL の構造制御について、最近の研究成果を紹介する。*P. tsukubaensis* が合成する MEL は、マンノースとエリスリトールからなる糖骨格に、2 分子のアシル基、1 分子のアセチル基が結合した構造をしており、糖転移酵素、アシル基転移酵素、アセチル基転移酵素が合成に関与している。発表者らはこれら MEL 合成関連酵素の遺伝子破壊により、アシル基をひとつしか持たないモノアシル型 MEL や、アセチル基を持たない脱アセチル型 MEL の合成に成功した。モノアシル型 MEL の量産に向けた培養技術についても併せて紹介する。

Basidiomycetous yeast strains belonging to genus *Pseudozyma* (partially renamed to genera *Moesziomyces* and *Sporisorium*) have been received attention because they produce mannosylerythritol lipids (MELs) known as a kind of biosurfactant with excellent interfacial activity. We found that MEL produced by *P. tsukubaensis* has moisturizing properties on the skin. Also, we have achieved the application of the MEL to cosmetics in collaboration with a company. To accelerate the use of MELs, we attempted to expand the structural variety of MELs by gene engineering techniques. MEL produced by *P. tsukubaensis* consists of mannose, erythritol, fatty acids and acetyl-groups (di-acylated and mono-acetylated MEL), and the four enzymes, that is, a glycosyltransferase, two acyltransferases and an acetyltransferase, involved in MEL biosynthesis. We recently produced mono-acylated MEL and deacetylated MEL as the main product by modification of MEL biosynthesis pathway. Here we also show a cultivation method to increase the amount of mono-acylated MEL produced by a gene-deleted strain of *P. tsukubaensis*.

Basidiomycetous yeast, Biosurfactant, Mannosylerythritol lipids

講演番号：4FS-03
講演日時、会場：3 月 21 日 15:50～ ミーティングルーム F

きのこにおける品種識別技術の開発について

Development of mushroom variety identification technology

○原田 慎嗣（ホクト株式会社）
○Shinji Harada (Hokuto Co., Ltd.)

きのこは日本における重要な特用林産物のひとつで、古くから日本人の食生活に関わってきた食品である。市販されているきのこには様々な品種があり、民間企業や公的研究機関などで日々品種改良が重ねられている。
日本のみならず、海外でもきのこの生産は多くなされており、日本に輸出されているものも少なくない。その中には日本で品種登録されている品種と同一と思われるものもあり、こういった育成者権の侵害となる輸入品は水際で流通を防ぐ必要がある。また、本年度の国会において種苗法の改正案が可決され、来年度の 4 月より施行となる。これは種苗の開発者の権利を保護することで国内における新品種の開発力向上を目的としたものであり、国内外問わず今後さらなる品種の流通適正化が求められることとなる。
きのこの品種の異同を判断するには、形態観察や対峙培養といった形態学的な手法が主であり、種苗法による育成者権の保護において最も重要な要素となっている。しかしながら検査精度や検査結果が得られるまでに要する時間の点において課題が多く、さらに迅速かつ正確に識別できる手法が求められている。
弊社ではこれまで自社栽培品種の品種識別技術の確立を農林水産省の補助事業の元で行ってきた。本発表では、これまでに開発してきた DNA マーカーによるきのこの品種識別技術について紹介するとともに、きのこの DNA による品種識別の現状に関しても簡単に紹介する。

Mushrooms are one of the most important special forest products in Japan, and have been a part of the Japanese diet for a long time. There are many varieties of mushrooms in the market, and breed improvement is being carried out by private companies and public research institutions.
There are several mushrooms imported into Japan from abroad that are suspected of infringing breeder's rights. Rapid and accurate variety identification technology is necessary for proper distribution. In this presentation, we will introduce the mushroom variety identification technology using DNA markers that we have developed, and also briefly introduce the current status of DNA-based variety identification.

Mushroom, Simple Sequence Repeat, Variety identification

講演番号：4FS-04
講演日時、会場：3 月 21 日 16:15～ ミーティングルーム F

C1 酵母で拓くメタノールバイオエコノミー

Methanol bioeconomy exploited by methylotrophic yeasts

○由里本 博也、阪井 康能（京大院農）
○Hiroya YURIMOTO, Yasuyoshi SAKAI (Kyoto Univ.)

天然ガスの主成分であるメタンから工業生産されるメタノールは、未利用バイオマスからの循環的生産も可能であり、様々な化成品の原料にもなることから、多様な炭素資源からメタノールを合成し、これを中心とする資源循環型工業体系「メタノールエコノミー」を構築することが提唱されている。一方、C1 化合物であるメタノールを単一炭素源・エネルギー源として生育可能なメタノール資化性酵母（C1 酵母）では、強力なメタノール誘導性プロモーターを利用した異種遺伝子発現系が開発され、異種タンパク質の高生産宿主として広く利用されており、C1 酵母のメタノール誘導機構は、メタノールエコノミーにおけるバイオプロセス「メタノールバイオエコノミー」において高度に活用することが期待される。本講演では、我々がこれまでに *Candida boidinii* や *Komagataella phaffii*（*Pichia pastoris*）を用いて明らかにしてきた、メタノール濃度に応答する遺伝子発現制御の分子機構とともに、C1 酵母のメタノールセンシング機構を利用したメタノール生成酵素活性評価とハイスループットスクリーニング法の開発事例を紹介する。

Methanol, which is industrially produced from natural gas (methane) and renewable biomass resources, has been a promising carbon source for chemical processes. "Methanol economy" has also been proposed, in which methanol is derived from various carbon resources and used as a fuel or a feedstock for various chemicals. Methylotrophic yeasts are capable of utilize methanol as the sole carbon and energy and have been used as hosts for heterologous protein production by using strong methanol-induced gene promoters. The mechanism of methanol-induced gene expression in methylotrophic yeasts is expected to be highly used in "methanol bioeconomy" in which a variety of useful compounds and proteins are biotechnologically produced from natural gas- or biomass-derived methanol. In this symposium, we will introduce our recent studies on the molecular mechanism of methanol-induced gene expression and its application for evaluation of methanol-producing enzyme activity.

methanol, methylotrophic yeast, Candida boidinii

講演番号：4FS-05
講演日時、会場：3 月 21 日 16:40～ ミーティングルーム F

Ogataea minuta でのバイオものづくり

Production of functional proteins by *Ogataea minuta*

○千葉 靖典[1]、横尾 岳彦[1]、馬場 悟史[2]、野中 浩一[2]([1]産総研・細胞分子、[2]第一三共・バイオ医薬研)
○Yasunori Chiba[1], Takehiko Yoko-o[1], Satoshi Baba[2], Koichi Nonaka[2] ([1]CBM, AIST, [2]Daiichi-Sankyo Co., Ltd.)

近年、製薬業界におけるバイオ医薬品の開発が進み、この部門の成長率は市場全体の成長率を上回ってきている。バイオ医薬品の生産のほとんどは目的遺伝子を導入した各種細胞により生産されており、特に大腸菌では発現が困難なタンパク質の生産において、酵母は正しい構造を有した機能性タンパク質として分泌生産できる場合が多い。この点でバイオ医薬品に限らず、有用タンパク質の「バイオものづくり」において酵母は優れた宿主であるといえる。

我々はバイオ医薬品を高効率に生産するため、メタノール資化性酵母 *Ogataea minuta* を宿主とした生産系の開発に取り組んできた。具体的には、宿主・ベクター系の開発、宿主株のプロテアーゼ欠損、シャペロン分子群の導入、培養条件の検討、酵母 *O*-型糖鎖修飾の薬剤による制御、プロモータや転写因子の解析などを行うことで、抗体や各種酵素、ウイルス様中空粒子など様々なタンパク質の高効率な生産を実証した。本シンポジウムではこれらの取り組みの概要に加え、*O. minuta* に関する最新の知見やタンパク質生産技術についても紹介する。

Protein-based therapeutics is the largest class of new drug candidates currently being developed by pharmaceutical companies in recent years. Yeast is used in one of the industrial fermentation organisms to produce therapeutic proteins. In contrast to *Escherichia coli*, yeast is capable of secreting functional and correctly folded functional proteins; thus, it makes an excellent host for the bioproduction of various therapeutic and functional proteins.

We have developed the methylotrophic yeast *Ogataea minuta* as a host for the efficient production of the therapeutic proteins (e.g., therapeutic antibodies, enzymes, and virus-like particles). In this seminar, we will discuss our role in its development and present a recent study.

yeast, protein, therapeutics

講演番号：4FS-06
講演日時、会場：3 月 21 日 17:05～ ミーティングルーム F

産業利用を目指した油脂酵母の油脂生産機構の解明とその応用

Elucidation of lipid production mechanism of oleaginous yeast for industrial use and its application

○高久 洋暁[1]、油谷 幸代[2]、荒木 秀雄[3]、正木 和夫[4]、家藤 治幸[5]、長沼 孝文[6]、山崎 晴丈[1]、髙木 正道[1] ([1]新潟薬大・応生科、[2]産総研・CBBD-OIL、[3]不二製油グループ本社、[4]酒類総研、[5]愛媛大、[6]山梨大)

○Hiroaki Takaku[1], Sachiyo Aburatani[2], Hideo Araki[3], Kazuo Masaki[4], Haruyuki Iefuji[5], Takafumi Naganuma[6], Harutake Yamazaki[1], Masamichi Takagi[1] ([1]NUPALS, [2]AIST, [3]FUJI OIL HOLDINGS INC., [4]NRIB, [5]Ehime Univ., [6]Yamanashi Univ.)

日本の油脂産業は海外からの輸入に大きく依存し、その自給率はわずか 13%です。この状況は、世界の油脂市場の環境、相場、各国の政策に左右され、我が国の油脂産業に危険信号を灯すと考えられます。我が国の農業事情や環境保護の観点から、広大な農地を開拓し、油糧作物による油脂生産の拡大は、日本にとって得策ではないと考えられます。すなわち、油糧植物への依存だけでなく、幅広く油脂資源を確保しておくことが必要です。我々は、油脂資源として油脂酵母に注目しました。油脂酵母は、他の油糧微生物と比較して最大油脂蓄積含有率が大きく、地域バイオマス由来の糖からの油脂生産が可能です。特に油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* は、グルコースだけでなく、キシロース、グリセロール、セルビオースなどの様々な炭素源を原料として、油脂を細胞内に 85%以上蓄積できるユニークな酵母です。この酵母を油脂資源として活用するには、油脂生産性に課題が残されており、*L. starkeyi* の油脂生産機構の解明とその知見を活用した油脂生産性の向上が必要です。本シンポジウムでは、①油脂生産機構の解明を目指した油脂蓄積変異株のユニークな取得法と取得した油脂蓄積変異株の特性及び油脂合成関連遺伝子の発現解析、②油脂蓄積変異株の解析から得られた知見を活用した油脂生産性の改善について紹介します。

本研究の一部は NEDO「植物等の生物を用いた高機能品生産技術の開発」の支援を受けて行われた。

In Japan, oil and fat industry relies heavily on imports of oil and fats, with a self-sufficiency rate of only 13%. Our oil and fat industry is considered to be in a dangerous state because it depends on global oil and fat market prices and policies of each country. Expanding vegetable oil production by oil plants is not a good strategy in terms of our agricultural situation and environmental protection. It is necessary not only to rely on oil plants, but also to secure a wide range of feedstocks. We focused on oleaginous yeasts as the feedstock, which have a large maximum lipid accumulation ability compared to other oleaginous microorganisms. In particular, oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi* is a unique yeast, which can accumulate intracellular lipids within cells to up to 85% of their dry cell. The improvement of lipid productivity in oleaginous yeast *L. starkeyi* is essential for the utilizing as feedstock. In this symposium, we will introduce the following two topics.

1. Elucidation of lipid production mechanism in oleaginous yeast *L. starkeyi*
2. The improvement of lipid productivity by utilizing the knowledge of lipid production mechanism

Oleaginous yeast, *Lipomyces starkeyi*, lipid

スポンサードシンポジウム プログラム

スポンサードシンポジウム（旧ランチョンセミナー）では，幅広い“農芸化学分野”に関わる企業関係の皆様から新製品や新技術等の情報を発信していただき，産学官連携の推進に努めております．

スポンサードシンポジウムは，事前申込の必要はなく，当日，どなたでもご参加いただけます．

オンライン登録受付番号と参加申込時の E-Mail アドレスを使用し，プログラム検索サイト（https://jsbba2.bioweb.ne.jp/jsbba2021/）にログインしてご聴講ください．

3 月 19 日（金）12:00 ～ 12:50

2BL　Noster 株式会社　　ミーティングルーム B

座長：小川 順（京都大学大学院農学研究科）

『科学と技術の結実、健康を導くポストバイオティクス “HYA” の幕開け』
腸内細菌による腸管内代謝と宿主のエネルギー糖代謝異常症

入江 潤一郎（慶應義塾大学医学部）

2DL　日本電子株式会社　　ミーティングルーム D

司会：上野 秀哉（日本電子株式会社）

新型クライオ電子顕微鏡 "CRYO ARMTM 300 II" とコロナ時代の NMR の自動化および遠隔操作の御紹介

細木 直樹，朝倉 克夫（日本電子株式会社）

2FL　SCIEX　　ミーティングルーム F

司会：花田 篤志（SCIEX）

過酸化脂質の LC-MS/MS 分析 からだの酸化機構？ アクロレインの新たな生成経路？

仲川 清隆（東北大学大学院農学研究科）

SCIEX テクノロジーについて

花田 篤志（SCIEX）

2HL　味の素株式会社　　ミーティングルーム H

司会：中沼 新吾（味の素株式会社）

血漿アミノ酸プロファイルに基づく、様々な疾患リスクのスクリーニング
～ アミノインデックス® の挑戦 ～

安東 敏彦（味の素株式会社）

3月20日（土）12:00 ～ 12:50

3BL　タカラバイオ株式会社　　ミーティングルーム B

ゲノム編集を学ぼう！そして始めよう！― CRISPR/Cas の原理、実施例、必要な製品のご紹介 ―

栗田 豊久（タカラバイオ株式会社）

3DL　Twist Bioscience　　ミーティングルーム D

司会：河合 岳志（Twist Bioscience）

『#WeMakeDNA - 合成生物学によるタンパク質の構造と機能解析へのアプローチ』

1. 合成遺伝子を利用したタンパク質の構造・機能解析

永田 宏次（東京大学大学院農学生命科学研究科）

2. 未来を創る：あなたの最高の研究アイデアを可能にする DNA ツール

河合 岳志（Twist Bioscience）

3FL　天野エンザイム株式会社　　ミーティングルーム F

座長：山口 庄太郎（天野エンザイム株式会社）

『消化の再現への挑戦　- ヒト胃消化シミュレーターへの取組みと今後の展望 – 』

1. ヒト胃消化シミュレーターの開発と応用
〜定量的なぜん動運動に伴う食品の消化挙動を観ながら評価する〜

小林 功（農業・食品産業技術総合研究機構）

2. ヒト胃消化シミュレーターによる消化酵素の有効性の評価

西尾 享一（天野エンザイム株式会社）

3HL　キッコーマン株式会社　　ミーティングルーム H

座長：佐藤 隆一郎（東京大学大学院農学生命科学研究科）

ビタミン K の新たな作用と健康機能

白川 仁（東北大学大学院農学研究科）

3月21日（日）12:00 ～ 12:50

4AL　オリシロジェノミクス株式会社　　ミーティングルーム A

PCR、大腸菌を超えるセルフリー長鎖環状 DNA 構築ツールの新展開

亀井 綾子（オリシロジェノミクス株式会社）

日本農芸化学会2021年度大会
Noster株式会社スポンサードシンポジウム
講演番号　2BL



「科学と技術の結実、健康を導く ポストバイオティクス“HYA”の幕開け」

座長　小川 順　先生
京都大学大学院農学研究科　教授

講師　入江 潤一郎　先生
慶應義塾大学医学部
腎臓内分泌代謝内科　講師

日時　2021年3月19日(金)
12:00～12:50

会場　ミーティングルームB
※Zoomでのオンライン開催

講演タイトル　腸内細菌による腸管内代謝と宿主のエネルギー糖代謝異常症

腸内細菌における曼荼羅のような食事脂質代謝の全体像が明かされたことを起点に、数多くの新規な脂肪酸代謝物の腸管内での存在が明らかにされてきました。加えて、多くの栄養学、薬学、医学研究者らの協働により、様々な健康サポート機能がHYAをはじめとする腸内細菌脂質代謝物に見いだされてきました。このことが、「腸内細菌の食事成分代謝物が健康増進の実行者として重要な役割を担っている」という、新たな「ポストバイオティクス」の科学的概念を打ち立てる契機となりました。

その後、HYAを広く社会に届けるべく、生産技術開発が行われました。一筋縄ではいかない難問が立ちはだかりましたが、研究者の緻密な観察に基づく創意工夫により、HYAを世に送り出す体制が整えられるに至りました。

「HYAは、食事に伴い腸管内で腸内細菌により作られる、我々の健康をサポートする代謝物です。」この単純明快な事実の科学的理解は、そして、それを皆さんに届けるための技術の確立は、多くの研究者の尽力の賜物であり成長の証なのです。食事成分の腸内細菌代謝物であるポストバイオティクスとしてのHYA。研究者たちのさらなる飛躍とともに大きく羽ばたくことを、2021年のその幕開けにあたり願ってやみません。

NOSTER®
Connecting life & gut microbiome.

日本農芸化学会 2021年度大会 スポンサードシンポジウム

講演番号　2DL

日時　3月19日（金）12:00～12:50



新型クライオ電子顕微鏡 "CRYO ARM™ 300 II" とコロナ時代の NMR の自動化および遠隔操作の御紹介

新型クライオ電子顕微鏡 "CRYO ARM™ 300 II"のご紹介

クライオ透過電子顕微鏡 (TEM) 法は試料を急速凍結することで溶液中の分子形態を保ったまま試料の観察を行うことができる手法です。近年単粒子解析法や電子線トモグラフィ法と言った三次元再構成法と組み合わされることにより脚光を浴びています。これらのアプリケーションを高いスループットおよび操作性と共に実現すべく開発されたクライオ電子顕微鏡“CRYO ARM™ 300”のリリースから約 3 年半、今回新たに“CRYO ARM™ 300 II”をリリースしました。“CRYO ARM™ 300 II”は電子ビーム制御による高速撮像、システム改良による操作性の向上、ハードウェアの安定性向上により、これまで以上のスループット・安定性・ユーザビリティーを提供します。本シンポジウムではこれらの新要素、新機能に加えて、最新のワークフローやデータの紹介を行います。



with コロナ時代の NMR測定自動化と遠隔操作

COVID-19 の拡大に伴い、分析機器においても３密を防ぐために、
自動測定機能や遠隔操作機能による無人運転の実現が求められています。
日本電子の NMR 装置はネットワーク接続に柔軟に対応しています。
複数の測定者による同時操作が可能であり、測定者同士の操作を妨げることのない遠隔操作が可能です。本シンポジウムでは、ネットワーク対応 NMR 装置“ECZ シリーズ”による NMR 測定の自動化と遠隔操作についてご紹介します。



製品に関するお問い合わせ先はこちらまで

03-6262-3567

FAX 03-6262-3577

科学・計測機器営業本部　SI 販売促進室

JEOL 日本電子株式会社

日本農芸化学会2021年度大会

［SCIEX共催］ランチョンセミナー



有機化合物の分析に必要不可欠なツール、質量分析装置。
その活用分野は、創薬研究、タンパク質や脂質などの生体成分の研究開発、
食品中の残留農薬試験や機能性成分についての研究など、あらゆるアプリケーションに広がりを見せています。
本セミナーでは、東北大学大学院農学研究科 教授 仲川清隆先生よりSCIEX 独自のイオントラップ QTRAP、またイオンモビリティー機能 SelexION® による分析例を交えてご紹介いただきます。質量分析を活用した先端の研究に触れるまたとない機会です。ぜひご参加ください。

過酸化脂質のLC-MS/MS分析

からだの酸化機構？ アクロレインの新たな生成経路？

東北大学大学院農学研究科
機能分子解析学分野 教授
仲川 清隆 先生

［講演要旨］

脂質などの酸化とその影響は、農芸化学領域の研究者の皆様の大きな関心のひとつと思います。脂質の酸化で生じる過酸化脂質（脂質ヒドロペルオキシド）の構造をLC-MS/MSで詳細に解析すると、（1）酸化の機構に加えて、（2）さらなる酸化（二次）生成物の構造を予測できるようになってきました。例えば、（1）ヒトの体は酸化で錆びる？とも揶揄されますが、そもそもどのように酸化される（「ラジカル」or「酵素」で酸化される）のかを調べられます。（2）では、もっぱらリノレン酸の酸化で生じると言われてきたアクロレイン（反応性が高いアルデヒド）が、ある脂肪酸の「光」酸化から生成する経路を見出しつつあります。本シンポジウムでは、こうした過酸化脂質（脂質ヒドロペルオキシド）のLC-MS/MS分析から見えてくる新たな世界を、皆様と共有できますと幸いです。

SCIEX テクノロジーについて

SCIEXアドバンストワークフロースペシャリスト　花田篤志
本研究でご活用いただいている、SCIEX QTRAP,SelexIONテクノロジーについてご紹介いたします。

日時 2021年3月19日（金）12:00～12:50
講演番号.：2FL（ミーティングルームF）
司会：花田篤志（SCIEX）

株式会社エービー・サイエックス
本社：〒140-0001　東京都品川区北品川 4-7-35　御殿山トラストタワー 21F
TEL：0120(318)551　FAX：0120(318)040
大阪：〒531-0072　大阪府大阪市北区豊崎 3-19-3　ピアスタワー 3F
www.sciex.jp　Email : jp_sales@sciex.com

The SCIEX clinical diagnostic portfolio is For In Vitro Diagnostic Use. Rx Only. Product(s) not available in all countries. For information on availability, please contact your local sales representative or refer to https://sciex.com/diagnostics. All other products are For Research Use Only. Not for use in Diagnostic Procedures. Trademarks and/or registered trademarks mentioned herein, including associated logos, are the property of AB Sciex Pte. Ltd. or their respective owners in the United States and/or certain other countries. © 2021 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. MKT07-944A

Eat Well, Live Well.

AJINOMOTO

日本農芸化学会2021年度大会

講演番号 2HL



血漿アミノ酸プロファイルに基づく、様々な疾患リスクのスクリーニング

～ アミノインデックス®の挑戦 ～

アミノ酸を測る。今のからだを知る。

aminoindex®

アミノインデックス®

日 時 2021年3月19日（金） 12時00分～12時50分

演 者 安東（あんどう） 敏彦（としひこ） / 味の素株式会社 アミノインデックス事業部

血液中のアミノグラムは常に一定になるようにコントロールされているが、多くの疾病では臓器の代謝が変化し、アミノグラムも影響を受けることが報告されている。実際、生理学的な状態と関連したアミノ酸濃度の具体的な異常は、肝不全、腎不全、癌、糖尿病、筋肉機能不全、先天的アミノ酸代謝異常などを含めて、様々な病気で報告されている。このことから、逆に、ある疾病によって引き起こされるアミノグラムの変化から疾病の有無を知ることができるのではないかと考えられた。しかし過去の研究では、特定の代謝異常等を除いて単一のアミノ酸濃度の動きから栄養状態や疾病の有無を判断することは難しいとされてきた。そこで、複数のアミノ酸の組み合わせを統計的に解析する新しい検査法を開発した。

2011年、アミノインデックス®は、がんに罹患しているリスクを評価する検査法として実用化された。その特長は、**①一度の採血で、複数のがんを同時に検査できる、②早期がんにも対応している、③採血による簡便な検査であり健康診断で同時に受診できる、**という点である。

さらに近年、アミノインデックス技術を用いて、生活習慣病のリスクを評価する方法が開発された。この検査は、**10年以内に脳卒中・心筋梗塞を発症するリスク、4年以内に糖尿病を発症するリスク、ロコモティブシンドロームなどの原因となるアミノ酸低栄養のリスク、認知機能低下リスクの4項目を評価**する。この検査結果に基づき、タイプ別に生活改善することで疾患のリスクを下げることがこの検査の目的である。

以上のようにアミノインデックス®は、様々な疾患のリスクを評価するのに有用であり、今後、ますます多くの健診現場で活用されることが期待されている。

共催：味の素株式会社

日本農芸化学会2021年度大会　スポンサードシンポジウム

ゲノム編集を学ぼう！そして始めよう！

― CRISPR/Casの原理、実施例、必要な製品のご紹介 ―

演者：栗田　豊久
タカラバイオ株式会社　営業支援部

3月 20日（土） 12:00-12:50

講演番号 3BL　ミーティングルームB

LIVE 配信

ゲノム上の狙った個所を自由に書き換えることができるゲノム編集ですが、CRISPR/Casシステムが2020年のノーベル化学賞を受賞し、さらに大きな注目が集まっています。本セミナーでは、なぜピンポイントでゲノム情報を書き換えることができるのか、そもそもCRISPR/Casって何？といった疑問にお答えするため、ゲノム編集、中でもCRISPR/Casにスポットを当て、その原理や特長を分かりやすくご説明いたします。
また、実際に自分でもCRISPR/Casを使ったゲノム編集をやってみたいという方のために、培養細胞を使用した簡単な実施例の紹介と、始める上で最低限揃える必要のある製品や成功率のUpにつながる製品など、タカラバイオの取り扱い製品を中心にご紹介いたします。

that's GOOD science!™

東京支店　TEL 03-3271-8553　FAX 03-3271-7282
関西支店　TEL 077-565-6969　FAX 077-565-6995
テクニカルサポートライン
TEL 077-565-6999　FAX 077-565-6995
Website　http://www.takara-bio.co.jp
Facebook　http://www.facebook.com/takarabio.jp

日本農芸化学会2021年度大会
スポンサードシンポジウム

講演番号 3DL | Saturday, March 20, 12:00 - 12:50

#WeMakeDNA - 合成生物学によるタンパク質の構造と機能解析へのアプローチ

共催企業：Twist Bioscience

司会：野口 匡則

講演者：

- **永田 宏次（東京大学 大学院農学生命科学研究科 応用生命化学専攻 食品生物構造学研究室 教授）**
- **河合 岳志（Twist Bioscience ビジネスデベロップマネージャー）**

合成遺伝子を利用したタンパク質の構造・機能解析

私の研究室では、食品の正の機能（抗菌・抗ウイルス・抗がん・抗酸化・抗糖化）と負の機能（発がん・アレルゲン性）を対象として、食品分子とヒト分子との分子間相互作用に着目し、食品中の機能性成分が作用するしくみを明らかにしていく研究を進めている。このような研究において、組換えタンパク質を活用し、標的タンパク質の機能と構造を明らかにしていくことが重要なステップとなる。本講演では、組換えタンパク質の発現において便利なツールである人工遺伝子を活用した例、および、今後活用したいと考えている例を紹介する。

企業講演タイトル

未来を創る：あなたの最高の研究アイデアを可能にするDNAツール

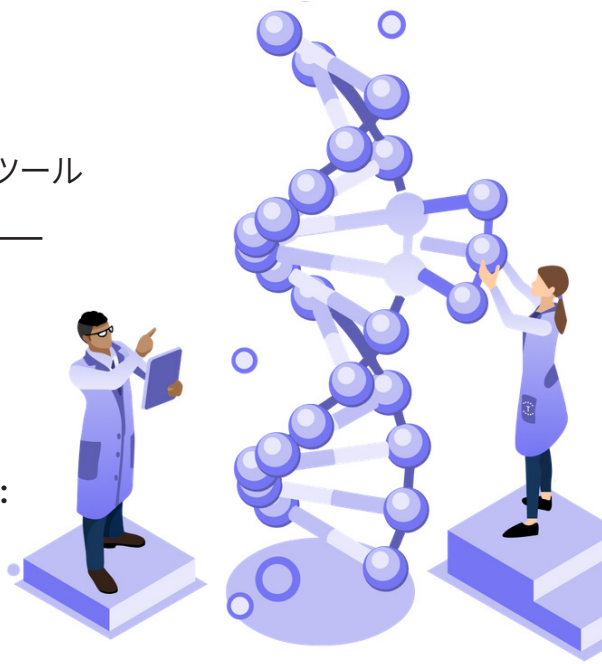
セミナー参加事前登録で当たる！

一等：Up to 10 kb of FREE Twist Gene Fragments*（1名様）

二等：Twist Bioscienceのラマのぬいぐるみ（10名様）

三等：Twist Bioscienceのノベルティセット（20名様）

当社ウェブサイトにある以下のフォームからご登録をお願いいたします：
https://pages.twistbioscience.com/JSBBA2021.html



是非ご登録ください。

【お問い合わせ先】
E-mail:jsalescustomer@twistbioscience.com

TWIST BIOSCIENCE

日本農芸化学会　2021年度大会

スポンサードシンポジウム　3FL

消化の再現への挑戦

-ヒト胃消化シミュレーターへの取組みと今後の展望 -

日時　令和3年**3**月**20**日（土）　**12**時**00**分～12時50分

会場　ミーティングルームF

座長　天野エンザイム株式会社　取締役 マーケティング本部副本部長
兼 開発統括部長・イノベーションセンター長　山口　庄太郎

ヒトの体内での消化プロセスは、唾液や胃液などによる化学的消化、咀嚼やぜん動運動による物理的消化、および腸内細菌による生物的消化に大別され、胃では消化酵素やpH などの化学的な作用に加え、ぜん動運動による内容物の流動・物理的な作用が生じます。胃における食品の消化状態は、胃もたれや膨満感だけでなく、その下流の腸における栄養成分の吸収に大きく影響すると考えられます。

本セミナーでは、ぜん動運動を再現したヒト胃消化シミュレーターの紹介および、実際の消化に近い条件で、可視化・定量化された消化酵素製剤の評価についてご報告します。

ヒト胃消化シミュレーターは、食品の消化の挙動をリアルタイムで直接観察して把握することが可能であり、消化性や消化プロセスを踏まえた食品の開発にも応用可能と考えられます。

1. ヒト胃消化シミュレーターの開発と応用
～定量的なぜん動運動に伴う食品の消化挙動を観ながら評価する～

国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 食品研究部門

小林 功 先生

2. ヒト胃消化シミュレーターによる消化酵素の有効性の評価

天野エンザイム株式会社　開発二部　メディカルチーム・リーダー　西尾　享一

特設WEBサイト「見えないもので世界はできている」
https://mienaimono.jp/ja/

AMANO
日本のバイオテクノロジーで、世界を変える

天野エンザイム株式会社
〒460-8630　愛知県名古屋市中区錦一丁目2番7号
TEL: 052-211-3032　FAX: 052-211-3054
https://www.amano-enzyme.co.jp/

日本農芸化学会 2021 年度大会

【講演番号３HL】

ビタミン K の新たな作用と健康機能

日時　３月 20 日（土）12：00～12：50

場所　ミーティングルームＨ

座長　佐藤　隆一郎　教授（東京大学大学院農学生命科学研究科　食品生化学研究室）

演者　白川　仁　　教授（東北大学大学院農学研究科　栄養学分野）

要旨

ビタミン K（VK）は、血液凝固に関する微量栄養素として、1934 年、デンマークの Henrik Dam によって発見された。いくつかの血液凝固因子の翻訳後修飾（特定のグルタミン酸残基の γ-カルボキシ化：Gla 化）において VK は必須の補因子として働く。また、骨基質タンパク質であるオステオカルシンも同様の修飾を受け活性化することから、VK は血液凝固系だけでなく、骨代謝とも密接に関連している。一方、近年になって、腫瘍細胞への増殖阻害や分化誘導、核内受容体 PXR のリガンド活性など、Gla 化以外の新しい機能について報告されている。天然に存在する VK は、緑色野菜に含まれる VK_1 と発酵食品や動物性食品に含まれる VK_2 がある。ヒトを含む高等動物では、摂取された VK は生体内で VK_2 のひとつであるメナキノン-4（MK-4）へと UBIAD1（UbiA prenyltransferase domain containing 1）を介して変換される。VK の生体内分布についてみると、肝臓や骨組織のほかにも分布が見られ、特に脳や膵臓、生殖腺に比較的多量の MK-4 が存在する。しかしながら、肝・骨以外の組織の VK、特に MK-4 の役割についてはほとんど明確となっていない。我々は、脳、膵臓、精巣の VK に着目して、VK の新たな生理活性の検索を行い、本ビタミンがホルモンの産生・分泌増強や抗炎症作用を持つことを見いだした。本セミナーではそれらの作用を解説し、VK の新たな健康機能性を紹介する。





共催：キッコーマン株式会社

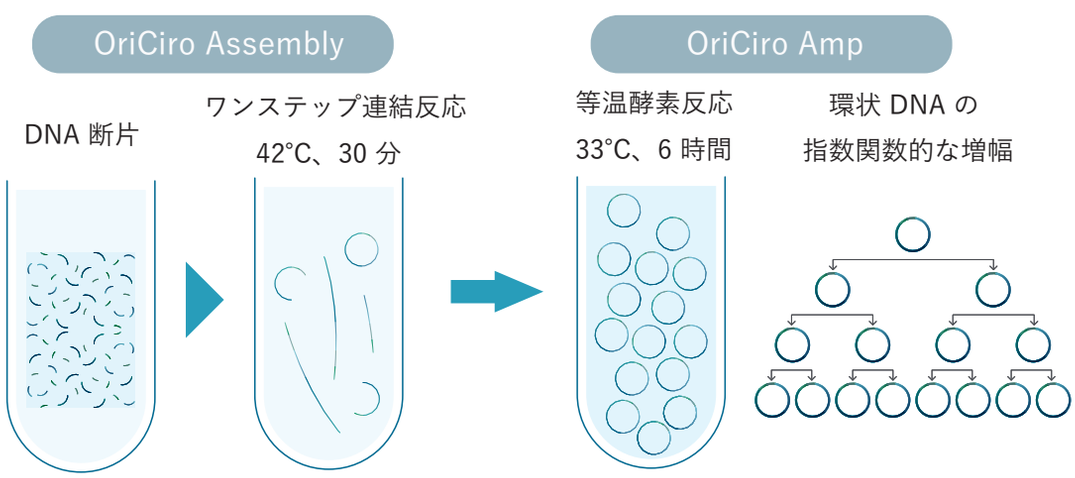
スポンサードシンポジウム 講演番号 4AL　ミーティングルーム A

PCR、大腸菌を超える
セルフリー長鎖環状 DNA 構築ツールの新展開

日時：2021 年 3 月 21 日（日）12：00 ～ 12：50

シンポジウム内容

本セミナーでは無細胞長鎖環状 DNA 合成ツールである OriCiro® Cell-Free Cloning System の仕様、先行技術に対する優位性や実験データ、また多彩なアプリケーションや新製品に関してご紹介いたします。
多くの研究室では約 50 年前に開発された大腸菌クローニングを行っておりますが、手間や時間がかかり毒性のある配列は増幅できないなどの問題点があります。OriCiro® Cell-Free Cloning System は複数の DNA 断片（最大 50 断片）を同時連結して環状化し、その連結産物を高濃度（最大 100 ng/μL）、高純度に増幅することが可能です。また、非常に高い増幅正確性（1 エラー /100 Mb/cycle）を実現し、最大 50 Kb の長鎖環状 DNA の増幅が可能です。PCR や大腸菌では困難な GC リッチやリピート、細胞毒性をもつ配列も増幅可能です。



講演者



亀井 綾子
オリシロジェノミクス株式会社
シニアリサーチマネージャー兼
シニアテクニカルサイエンティスト

OriCiro

オリシロジェノミクス株式会社
東京都文京区本郷 7-3-1 東京大学南研究棟 318
TEL : 03-3868-3610
e-mail : product@oriciro.com
https://www.oriciro.com/

本書の内容の一部または全部を無断で複写複製（コピー）及び転載することは、法律で認められた場合を除き、権利の侵害となりますので、あらかじめ本会あて許諾を求めてください。
Copyright © 2021 by Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry

日 本 農 芸 化 学 会 2021 年 度 大 会 講 演 要 旨 集 （オンライン）
Program & Proceedings (online) of the Annual Meeting 2021 Sendai of
Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry
2021 年 3 月 5 日公開　Published online 5 March 2021　ISSN 2186-7976

発行者　公益社団法人日本農芸化学会　JSBBA　https://www.jsbba.or.jp/
PUBLISHER　113-0032 東京都文京区弥生 2-4-16 学会センタービル 2 階　Phone 03-3811-8789

データ作成者 株式会社ダイナコム　DYNACOM　https://www.dynacom.co.jp/
ASSISTS　261-7125 千葉県千葉市美浜区中瀬 2-6-1WBG マリブイースト 25 階　Phone 043-213-8131
小宮山印刷工業株式会社　KOMIYAMA PRINTING　https://www.kopas.co.jp/